

**DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER
PROTEASENINHIBITOREN ALPHA₁-ANTITRYPSIN,
ALPHA₂-MAKROGLOBULIN UND DES
NIEDERMOLEKULAREN, SAURESTABILEN
SCHLEIMHAUTINHIBITORS BEI DER
CHRONISCHEN MITTELOHREITERUNG**

Thomas Brohr

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553810_0071

Aus der HNO - Universitätsklinik München
Direktor : Professor Dr.med. H. H. Naumann
Leiter des biochemischen Labors :
Professor Dr. K. Hochstraßer

DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER PROTEASEN-
INHIBITOREN ALPHA₁ - ANTITRYPSIN, ALPHA₂ -
MAKROGLOBULIN UND DES NIEDERMOLEKULAREN,
SÄURESTABILEN SCHLEIMHAUTINHIBITORS BEI DER
CHRONISCHEN MITTELOHREITERUNG

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnmedizin
verfaßt und einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von
Thomas Brohr
aus
Burghausen an der Salzach
München 1977

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter :

Professor Dr. med. H. H. Naumann

Privatdozent Dr. med. E. Kastenbauer

Dekan :

Professor Dr. med. W. Spann



Tag der mündlichen Prüfung : 26. Juli 1977

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Herrn Professor Dr. H.H. Naumann danke ich
für die guten Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent
Dr. E. Kastenbauer für die Überlassung des
Themas, sein großes Interesse an der Arbeit
und seine dauernde Bereitschaft, Verbesserungs-
vorschläge und Anregungen zu geben.

Herrn Professor Dr.K. Hochstraßer danke ich
sehr für die Bereitstellung eines Arbeits-
platzes in seinem Labor, für seine wertvollen
Ratschläge und für seine große Geduld in der
Beantwortung von Fragen.

Schließlich möchte ich mich bei Frau Heindl
und Fräulein Lempart für die Hilfestellung
bei versuchstechnischen Problemen bedanken.

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen :

α_1 -AT	=	α_1 -Antitrypsin
α_2 -M	=	α_2 -Makroglobulin
ImU	=	Inhibitor-Milli-Einheit (-unit)
ITI	=	Inter-alpha-Trypsin-Inhibitor
ssI	=	säurestabiler Schleimhautinhibitor (säurestabile antiproteolytische Aktivität) in entzündlichen Ohrse- kreten

I N H A L T S Ü B E R S I C H T

	Seite
A. Einleitung	1
B. Theoretischer Teil	4
I. Wirkungsmechanismus der Proteasen- inhibitoren	4
II. Struktur der Proteaseninhibitoren	6
III. Das α_1 - Antitrypsin (α_1 -AT)	7
1. Struktur und chemische Eigenschaften	7
2. Hemmspezifität, physiologische und pathologische Bedeutung	8
IV. Das α_2 - Makroglobulin (α_2 -M)	10
1. Struktur und chemische Eigenschaften	10
2. Hemmspezifität, physiologische und pathologische Bedeutung	11
3. Der besondere Wirkungsmechanismus des α_2 -M	13
V. Säurestabile Proteaseninhibitoren	15
1. Säurestabile Proteaseninhibitoren in Serum und Harn	15
2. Der säurestabile Proteaseninhibitor in Sekreten des oberen Respirationstrakts	18
C. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse	20
I. Auswahl und Beschreibung des Unter- suchungsmaterials	20

II. Vorbereitung der Sekretproben	20
III. Ermittlung des Gesamtproteingehaltes jeder Sekretprobe	21
1. Zielsetzung und methodisches Vorgehen	21
2. Ergebnisse	21
IV. Ermittlung der Konzentrationen an α_1 - Antitrypsin und α_2 - Makroglobulin in den Sekretproben	22
1. Methodisches Vorgehen	22
2. Ergebnisse	25
a) α_1 -AT - Konzentrationen	25
b) α_2 -M - Konzentrationen	33
V. Ermittlung der Konzentration an säure- stabilem Schleimhautinhibitor (ssI) in den Sekretproben	41
1. Methodisches Vorgehen	41
2. Ergebnisse	42
VI. Ermittlung der Anteile von freiem und maskiertem säurestabilem Schleimhaut- inhibitor (ssI) in den Sekretproben	51
1. Zielsetzung	51
2. Versuchsablauf	51
3. Ergebnisse	52

VII. Bestimmung des Molekulargewichts des säurestabilen Schleimhautinhibitors im Ohrsekret (ssI)	54
1. Methodisches Vorgehen	54
2. Ergebnisse	55
VIII. Vergleich der Anteile der drei Inhibi- toren α_1 -AT, α_2 -M und ssI an der Gesamthemmkapazität der Ohrsekrete bei Cholesteatom- und Schleimhauteiterung	55
1. Berechnung der Gesamthemmkapazität und der prozentualen Anteile der Inhibitoren an ihr	55
2. Vergleich der Konzentrationen von α_1 -AT, α_2 -M und ssI in den Sekreten von Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen	59
IX. Zusammenstellung sämtlicher untersuchten Sekretproben mit Gesamtproteinmengen, Inhibitorkonzentrationen und Bakteriologie	62
D. Diskussion	66
E. Experimenteller Teil	71
I. Vorbereitung der Sekretproben	71

II. Die Ninhydrin - Reaktion zur Ermittlung der Gesamtproteinmenge pro Sekretlösung	71
1. Prinzip	71
2. Material	72
3. Methode	72
III. Mancini-Test mit M-Partigen ^(R) -Immun-diffusionsplatten	73
1. Prinzip	73
2. Material	73
3. Methode	74
IV. Enteiweißung der Sekretlösungen	76
V. Trypsin-Hemmtest zur Ermittlung der ssI-Konzentration und der Gesamthemmung	76
1. Prinzip	76
2. Material	77
3. Methode	77
VI. Bestimmung des Molekulargewichts des ssI durch Gelfiltration mit Sephadex ^(R) - G 75	79
1. Prinzip	79
2. Material	79
3. Methode	80

F. Zusammenfassung	81
G. Literaturverzeichnis	83
H. Lebenslauf	94

A. EINLEITUNG

Unter den hydrolytisch wirkenden Enzymen nehmen die Proteasen einen wichtigen Platz ein. Sie katalysieren die Spaltung der Peptidbindung von Proteinen.

Ihre enzymatische Aktivität kann durch sogenannte Proteaseninhibitoren dadurch eingeschränkt oder blockiert werden, daß sich diese Stoffe an die betreffenden Proteasen in meist reversibler Reaktion anlagern und einen Enzym - Inhibitor - Komplex bilden.

Die Aufgabe dieser Proteaseninhibitoren besteht allgemein darin, den "Angriff" sowohl körpereigener als auch körperfremder Proteasen auf biologisch wichtige Proteine und Gewebe mit Proteinstruktur zu verhindern oder eine Proteolyse zeitlich und räumlich zu begrenzen. Über ihre physikalische Aufgabe (z.B. Abbau von Nahrungsproteinen) hinausgehend kann die ungehemmte Wirkung von Proteasen schädliche Einflüsse mit sich bringen. So zerstört zum Beispiel bei der akuten Arthritis ein elastaseähnliches proteolytisches Enzym aus polymorphkernigen Leukozyten (PMN) elastische Fasern von Arterien und Basalmembranen von Gefäßen (27). Auch andere PMN - Proteasen können, wenn ihre Aktivität nicht durch Inhibitoren gebremst wird, autodestruktiv durch Auflösung von Gewebsstrukturen wirken.

Für Entstehung und Verlauf von chronischen Mittelohrentzündungen scheinen Proteasen und ihre Inhibitoren ebenfalls von erheblicher Bedeutung zu sein. Erst kürzlich wurde von HOCHGESAND und Mitarbeitern (14) in Sekretproben aus chronisch entzündeten Mittelohren durchwegs eine hohe proteolytische Aktivität festgestellt, die auf Gewebsproteasen, leukozytäre und bakterielle Proteasen zurückgeführt wird.

Unter den Gewebsproteasen ist besonders eine Kollagenase hervorzuheben, die ABRAMSON (1) in erhöhter Konzentration im Plattenepithel des Cholesteatoms nachgewiesen hat und die er wegen ihrer gegenüber der Hautkollagenase wesentlich stärkeren Aktivität mitverantwortlich macht für Ossiculadestruktionen bei Cholesteatomen. Leukozytäre Proteasen werden im Verlauf einer Entzündung aus zerfallenden Leukozyten freigesetzt. Unter den bakteriellen Proteasen verdient die des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* (pyocyanea) besondere Beachtung. Dieses Stäbchenbakterium ist an der pathogenen Keimflora der Paukenhöhlenschleimhaut bei Mittelohrentzündungen sehr häufig beteiligt und produziert in großen Mengen sehr aktive Proteasen mit einem pH-Optimum im physiologischen Bereich (24), darunter eine Protease mit Elastase-Eigenschaft (39). Auch andere Autoren sehen die hohe Pathogenität des *Pseudomonas aeruginosa* in der ungezügelten Proteasenproduktion (37), die in direktem Zusammenhang mit der Virulenz dieses Keimes steht.

Der pathogene Einfluß dieser Proteasen auf den Verlauf von Mittelohrentzündungen zeigt sich außer in der wahrscheinlich destruierenden Wirkung auf die Gehörknöchelchen (1, 31) insbesondere darin, daß sie intakte, über die Blutbahn herangeführte oder lokal gebildete Immunglobuline abbauen können, wenn sie ein Übergewicht gegenüber dem inhibitorischen System erlangen. Diese Schwächung der Immunabwehr kann zu einer Chronifizierung von Ohreiterungen beitragen (30, 59).

Als Inhibitoren gegen Proteasen stehen dem Organismus vor allem Plasmainhibitoren zur Verfügung : Alpha₁-Antitrypsin, alpha₁-Antichymotrypsin, Inter-alpha-Trypsininhibitor, Antithrombin III, C 1-Inaktivator, alpha₂-Makroglobulin und andere. Darunter verdienen

α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) und α_2 -Makroglobulin (α_2 -M) schon wegen ihrer hohen Konzentration im Plasma und ihrer noch zu erörternden Spezifität besondere Beachtung auch bei Mittelohrentzündungen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in Ohrsekreten von Patienten, die an chronischer Mittelohreiterung in Form der Cholesteatom- oder Schleimhauteiterung leiden, den Gehalt an α_1 -AT und α_2 -M zu untersuchen.

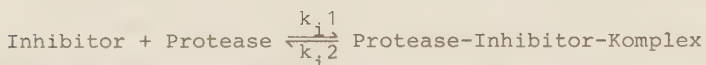
HOCHSTRASSER und Mitarbeiter fanden im oberen Respirationstrakt - also in mit Flimmerepithel ausgekleideten Bereichen - polyvalente, niedermolekulare, säurestabile Inhibitoren (20, 22, 46). Nachdem die Paukenschleimhaut in etwa ein modifiziertes, respiratorisches Epithel darstellt (51), lag ein weiteres Ziel dieser Arbeit nahe, nämlich die Sekrete von Mittelohreiterungen auch auf das Vorkommen eines niedermolekularen, säurestabilen Inhibitors (ssI) hin zu untersuchen.

Weiterhin kam es darauf an, den Gehalt dieser Inhibitoren auch aus Ohrsekreten in der postoperativen Heilphase zu ermitteln und mit dem Inhibitorspiegel in der praeoperativen Phase zu vergleichen. Dadurch sollten Rückschlüsse auf den Heilungsvorgang in Abhängigkeit vom Inhibitorspiegel gezogen werden.

B. THEORETISCHER TEIL

I. Wirkungsmechanismus der Proteaseninhibitoren

Die auf eine zeitliche und räumliche Begrenzung von proteolytischen Vorgängen zielende Hemmwirkung der Proteaseninhibitoren beruht in der Regel (eine Ausnahme bildet der erst später zu besprechende Hemmmechanismus des α_2 -M) auf einer reversiblen Komplexbildung mit den Proteasen :



Die Inhibitorkonstante k_i drückt die Gleichgewichtslage der Reaktion aus und wird vom pH sowie vom Konzentrationsverhältnis Protease zu Inhibitor beeinflusst :

$$k_i = \frac{P \times I}{PI}$$

P = molare Konzentration der Protease;

I = molare Konzentration des Inhibitors;

PI = molare Konzentration des Komplexes.

Der Protease - Inhibitor - Komplex wird durch Anlagerung des reaktiven Zentrums des Inhibitors an das aktive Zentrum der Protease gebildet.

Während aber ein Enzym - Substrat - Komplex in den Enzym - Produkt - Komplex übergeht und das Reaktionsprodukt abdissoziiert, kann bei der Reaktion zwischen Protease und Inhibitor dieses Reaktionsmodell unterbrochen sein :

1. Die Hemmung kann bereits durch die einfache Anlagerung einer funktionellen Gruppierung des Inhibitors an das aktive Zentrum des proteolytischen Enzyms erfolgen. Bei dieser Anlagerung dürfte es sich um eine salzartige Bindung zwischen der epsilon-Aminogruppe des Lysinrestes oder der Guanidino-Gruppe des Argininrestes (nur diese zwei Arten von aktiven Zentren gibt es bei Proteaseninhibitoren, s. unten) an den Asparaginsäurerest im aktiven Zentrum des Trypsins (häufigstes Substrat der Inhibitoren) handeln. Der Inhibitor verändert sich dabei nicht (6) (Abb. 1).

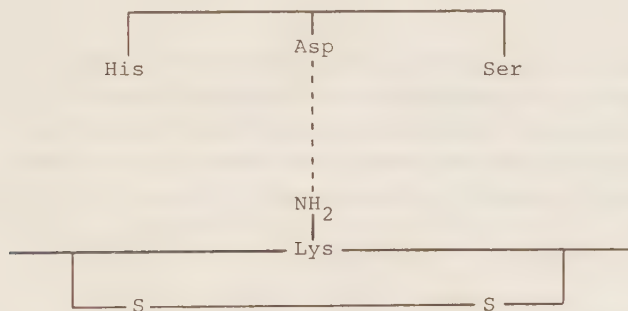


Abb. 1

2. Über diese einfache Komplexbildung hinaus kann aber auch eine definierte Peptidbindung im Inhibitormolekül aufgespalten werden, ohne daß das Molekül in die Spaltprodukte zerfällt. Es bildet sich ein Acyl - Enzym - Komplex, der auf der Stufe eines Enzym - Produkt - Komplexes stehenbleibt und nur durch Auflösung der Raumstruktur mit Hilfe von H - Brücken - lösenden Substanzen zerstört werden kann (25) (Abb. 2).

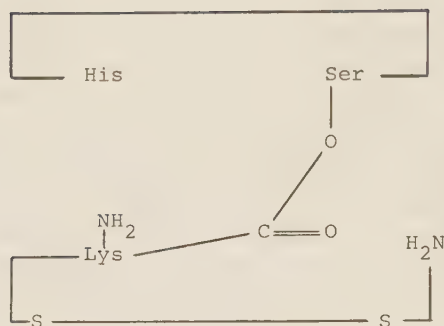


Abb. 2

3. Eine hohe Dissoziationskonstante eines Protease-Inhibitor - Komplexes kann dazu führen, daß dauernd Proteasen frei werden und weitere Peptidbindungen im Inhibitormolekül angreifen; der Inhibitor verliert dadurch Stabilität und Hemmwirkung ("temporary inhibition") (35).

II. Struktur der Proteaseninhibitoren

Die bislang bekannten Proteaseninhibitoren weisen die Struktur von Polypeptiden auf. Bei den Plasmainhibitoren handelt es sich durchwegs um Glykoproteine, wobei aber der Kohlenhydratanteil für die Hemmfunktion offensichtlich unwesentlich ist (11). Die Molekulargewichte reichen von 5000 (Pankreasinhibitoren) bis weit über 700 000 (α_2 -M).

Trypsininhibitoren - das sind fast alle Inhibitoren - können in sogenannte Lysin- und Arginininhibitoren eingeteilt werden. Erstere enthalten in ihrem aktiven Zentrum einen für die Ausbildung des Trypsin- Inhibitor-

Komplexes verantwortlichen Lysinrest. Bei den Arginininhibitoren kennzeichnet ein Argininrest das aktive Zentrum. Eine Unterscheidung kann leicht dadurch getroffen werden, daß Lysinhibitoren durch Acylierung der epsilon - Aminogruppen der Lysinreste inaktiviert werden, wohingegen Argininhibitoren aktiv bleiben.

III. Das α_1 - Antitrypsin (α_1 -AT)

1. Struktur und chemische Eigenschaften

Das Interesse an dem Serumprotein α_1 -AT, das den Hauptbestandteil der α_1 -Fraktion ausmacht, hat seit einigen Jahren sehr zugenommen, nachdem es im Jahre 1962 von SCHULTZE beschrieben worden war (53). Neuere Untersuchungen (33, 60) zeigen, daß der Proteinanteil etwa 85 % beträgt und der Rest von Kohlenhydraten gebildet wird, und zwar von Hexosamin, Hexosen (Mannose, Galaktose) und Acetylneuraminsäure. Fucose ist - entgegen früherer Auffassung (55) - nicht beteiligt. Es handelt sich also um ein Glykoprotein.

Die Angaben über das Molekulargewicht schwanken : Die mit Hilfe von Sedimentations- und Diffusionskonstante errechneten Werte reichen von 45 000 (61) bis 59 000, die aus der Analyse der Aminosäurereste sich ergebenden Werte von 54 200 (20) bis 61 500 (55). Nach den schon oben genannten neueren Untersuchungen dürfte der Wert zwischen 54 000 und 58 000 liegen.

α_1 -AT ist nur im pH-Bereich von 6,0 bis 9,8 stabil. Bei pH 5 geht die Inhibitoraktivität teilweise verloren, bei pH 4,0 schwindet sie unmittelbar und vollständig und kann auch kaum wiederhergestellt werden (33).

Die Instabilität im pH - Bereich unter 6, die bekannte Labilität gegenüber Hitze und die Unfähigkeit, den teilweise inaktivierten Inhibitor zu 100 % zu reaktivieren, könnte damit erklärt werden, daß in diesem verhältnismäßig großen Molekül nur 1 Disulfidbrücke vorhanden ist. Ein Mangel an SS - Brücken in Proteinmolekülen vermindert bekanntlich deren Stabilität (55).

Alpha₁-AT kann als äußerst polymorphes Protein bezeichnet werden : Mit Hilfe der Stärkegelelektrophorese lassen sich unter sauren Bedingungen 21 Phänotypen unterscheiden (34). Bei einer Elektrophorese im alkalischen Bereich wandert alpha₁-AT als eine größere und eine kleinere Komponente. Unter den Bedingungen einer sauren Stärkegelelektrophorese teilt es sich dagegen in 8 Proteinbande auf, die eine verschiedene Intensität besitzen (7).

Die alpha₁-AT - Phänotypen werden gemäß der Beweglichkeit der 8 Proteinbande nach dem "Pi"-System eingeteilt : Man bezeichnet die kontrollierenden Gene mit Pi und einem bestimmten Buchstaben (E,F,G,I,M,P,R,S,V,W,X,Z). Der am meisten verbreitete Phänotyp wird vom Gen Pi^M kontrolliert und zeigt sich als Phänotyp MM. Ein Gen, das Pi^Z genannt wird, kontrolliert die besonders seltene Variante ZZ (34).

2. Hemmspezifität, physiologische und pathologische Bedeutung

Alpha₁-AT, dessen normale Konzentration im Serum 200 - 400 mg/100 ml beträgt, besitzt ein weites Hemmspektrum. Zunächst wirkt es als Trypsininhibitor (1 µg alpha₁-AT hemmt 0,4 bis 0,6 µg Trypsin zu 100 %) und ist für die antitryptische Wirkung des Serums hauptverantwortlich (54, 61). Es vermag aber auch Chymotrypsin, Elastase,

Kollagenase, Plasmin sowie Proteasen aus Leukozyten und bestimmten Bakterien zu hemmen (13). Alpha₁-AT inhibiert zum Beispiel die alkalische Protease aus dem *Bacillus subtilis* (58). Kürzlich ist über die Hemmfähigkeit von alpha₁-AT gegenüber Acrosin - einem proteolytischen, trypsinähnlichen Enzym, das in Spermatozyten gefunden wurde - berichtet worden (9). Alpha₁-AT ist aber auch an der Kontrolle des Kallikrein - Kinin - Systems beteiligt, das für die Produktion von vasodilatierenden Peptiden verantwortlich ist (58).

Die große Bedeutung von alpha₁-AT zeigt sich auch darin, daß dieser Inhibitor besonders leicht in den extravaskulären Raum übertreten kann und in Geweben, sekretorischen Organen und Körperflüssigkeiten, vor allem Sekreten, gefunden wird. Innerhalb einer Beobachtungszeit von 48 Stunden wandern 90 % des markierten alpha₁-AT in den extravaskulären Raum (58).

In der englischen Literatur wird alpha₁-AT vielfach als "acute phase protein" bezeichnet. Seine Konzentration steigt in der Schwangerschaft, nach Verabreichung von Vaccinen oder Östrogenen, vor allem aber während bestimmter Entzündungszustände an (58). Beispielsweise fand man bei Patienten mit Peritonitisabszessen, Anginen und Nebenhöhlenentzündungen eine erhöhte alpha₁-AT - Konzentration im Serum, obwohl ein Verbrauch durch Komplexbildung mit Proteasen nachzuweisen war (13).

Andererseits scheinen alpha₁-AT - Mangelzustände in ursächlicher Verbindung mit einigen schweren Krankheitsbildern zu stehen. So dürften nach LAURELL und ERIKSSON (36) eine Erniedrigung der alpha₁-AT - Konzentration - das ist bei Menschen mit dem Phänotyp ZZ

der Fall - verantwortlich sein für bestimmte Formen des chronisch obstruktiven Lungenemphysems, jedenfalls soweit es sich um homozygote Merkmalsträger handelt. Als Ursache wird angenommen, daß proteolytische Enzyme aus Granulozyten und Makrophagen infolge des α_1 -AT-Mangels ungehindert wesentliche Strukturen des Lungengewebes (elastische Fasern und Basalmembranen) andauern können. Tatsächlich wurde in menschlichen Granulozyten eine mikrosomale Elastase nachgewiesen (26). Diese Hypothese wurde kürzlich auch durch Tierexperimente bekräftigt : Die Inhalation von Proteasen als Aerosol führte bei den Tieren zu Krankheitsbildern, die Lungenemphysemen ähneln (32).

Auch Leberstörungen sind bei α_1 -AT - Mangel beobachtet worden, nämlich Lebercirrhose im Kindesalter sowie Lebercirrhose und -fibrose im Erwachsenenalter (56).

IV. Das α_2 - Makroglobulin (α_2 -M)

1. Struktur und chemische Eigenschaften

Das α_2 -M gehört der α_2 -Globulinfraction des Serums an und ist, wie alle Proteaseninhibitoren des Blutplasmas, ein Glykoprotein. Als Molekulargewicht wurde bisher meist 820 000 angenommen, ein Wert, den SCHÖNENBERGER und andere (52) aus der Sedimentations- und Diffusionskonstanten erhielten. Zwischen diesem Wert und dem vor einiger Zeit veröffentlichten Wert 650 000 (50) liegt der kürzlich von mehreren Autoren ermittelte Wert von 725 000 (28, 49).

Das Molekül besteht zu mehr als 90 % aus Aminosäuren und zu etwa 8 % aus Kohlenhydraten (Hexose, Fucose, Acetylhexosamin, Acetylneuraminsäure). Es kann im Vergleich zu α_1 -AT als relativ hitzestabil bezeichnet werden. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,4 (52, 61).

2. Hemmspezifität, physiologische und pathologische Bedeutung

α_2 -M zeigt eine sehr breit gestreute Spezifität. Es verbindet sich (11) :

- a) mit den meisten Endopeptidasen (auch von Tieren, Bakterien und Pflanzen), und zwar mit Trypsin, Kallikrein, Plasmin, Thrombin, Acrosin, Kathepsin B₁, Kathepsin D, Papain, Bromelain, Ficin, Thermolysin, Clostridiopeptidase A, Kollagenase,
- b) mit der Carboxypeptidase (Exopeptidase),
- c) mit der Aspartataminotransferase und den Phytohämagglutinen (Nicht - Peptidasen).

Weitere Beispiele für das Hemmvermögen von α_2 -M folgen noch, wenn über die pathologische Bedeutung dieses Inhibitors berichtet wird.

Die Konzentration des α_2 -M im Serum beträgt bei Männern 150 - 350 mg/100 ml, bei geschlechtsreifen Frauen 175 - 420 mg/100 ml. Der höhere Wert bei Frauen beruht möglicherweise auf einer Östrogenabhängigkeit des Serumspiegels (5).

Während bei normalen physiologischen Bedingungen 80 - 90 % des α_2 -M wegen der Molekülgröße im intravasculären Raum verbleiben, kann bei Entzündungsvorgängen

α_2 -M in die Gewebe übertreten, da dann die Gefäß-permeabilität ansteigt (3). So konnte bereits 1 Stunde nach einer Brandverletzung ein 5-facher Anstieg der α_2 -M - Konzentration im extravaskulären Raum beobachtet werden. Auch lassen sich erhebliche Mengen von α_2 -M - Kollagenase - Komplexen in der Gelenkflüssigkeit von rheumatischen Gelenken finden, wobei die Kollagenase, die wohl an dem Gelenkknorpelabbau im arthritischen Gelenk mitwirkt, gänzlich inaktiv gegenüber Kollagen wird (62).

α_2 -M hat erheblichen Anteil an der Abwehr des Körpers gegen eingedrungene pathogene Keime. Denn allein α_2 -M scheint die Fähigkeit zu haben, als Inhibitor zu wirken gegenüber der Keratinase aus *Trichophyton mentagrophytes* (Pilz, der Dermatomykosen verursacht), der Kollagenase aus *Clostridium histolyticum* (kann Gasbrand verursachen) und der Proteinase aus *Pseudomonas aeruginosa*, über dessen Pathogenität schon berichtet wurde (3). Darüber hinaus hemmt α_2 -M die Proteinase aus *Staphylococcus aureus* und *Proteus vulgaris* im menschlichen Sputum sowie die Proteinase aus *Bacillus subtilis*, der zu allergischen Reaktionen in der Lunge Anlaß geben kann (3).

Bei einer fibrinolytischen Therapie verbindet sich α_2 -M mit Plasminogen, während die anderen Proteasen-inhibitoren kaum beeinflußt werden. Daraus, daß während einer Langzeittherapie das gesamte Plasminogen verbraucht wird, kann geschlossen werden, daß die starke und augenblickliche Hemmkapazität des α_2 -M gegenüber Plasmin der verfügbaren Menge Plasminogen entspricht (11).

Die Fähigkeit des α_2 -M, sich mit Trypsin zu verbinden, ist insofern von großer Bedeutung, als Komplexe zwischen Trypsin und α_2 -M aktivierend auf Plasminogen, Trypsinogen und Chymotrypsinogen wirken (47). Schließlich soll noch darauf hingewiesen werden, daß α_2 -M - Komplexe möglicherweise als Reservepools für Thrombin wirken und die hämostatische Balance regulieren (48).

3. Der besondere Wirkungsmechanismus des α_2 -M

Die Reaktion des α_2 -M mit Proteasen zeigt einige Besonderheiten (3) :

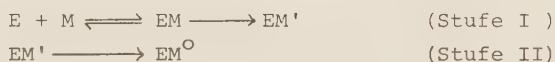
Zunächst reagieren proteolytische Enzyme nur in katalytisch aktiver Form mit α_2 -M. Weiterhin ist die Bindung der Protease irreversibel. Auch kann ein einzelnes α_2 -M - Molekül nach der Auffassung von BARRETT und STARKEY (3) mit einem einzigen Proteasenmolekül reagieren. Dieser Gesichtspunkt ist jedoch umstritten. Andere Autoren nehmen ein Reaktionsvermögen mit zwei (47) Enzymmolekülen an.

Ein wesentlicher Unterschied zu anderen Proteaseninhibitoren wie zum Beispiel α_1 -AT zeigt sich darin, daß an α_2 -M gebundene proteolytische Enzyme in ihrer Aktivität gegenüber großen Substratmolekülen fast vollständig gehemmt sind, während die Aktivität derselben Enzyme gegenüber niedermolekularen Substraten weitgehend erhalten bleibt. Diese verbleibende Aktivität des Enzyms wird durch die Bindung an α_2 -M auch vor dem "Angriff" von hochmolekularen Inhibitoren geschützt.

Die genannten Besonderheiten haben BARRETT und STARKEY (3) veranlaßt, den folgenden, unter den bekannten Inhibitoren einzigartigen Wirkungsmechanismus anzunehmen :

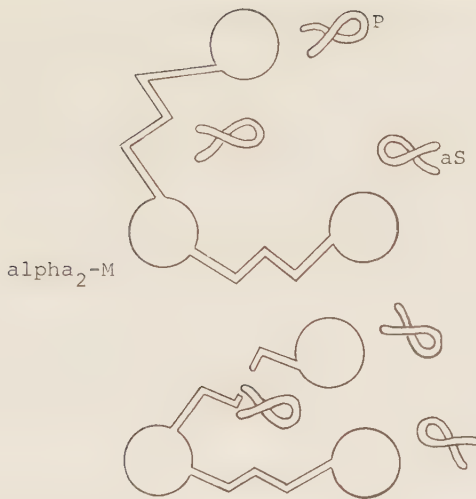
Die Reaktion beginnt mit einem proteolytischen Angriff auf das α_2 -M - Molekül (Spaltung einer Peptidbindung). Dies führt zu einer lokalen Konformationsänderung des α_2 -M mit der Folge, daß das Enzym irreversibel inmitten des Inhibitors eingeschlossen wird. Die Hemmung des Enzyms wird also durch die räumliche Verhinderung des Substratzuganges bewirkt. Das proteolytische Enzym kann weder "entkommen" noch durch andere Proteasen verdrängt werden.

Der Zwei - Stufen - Prozess kann demnach so beschrieben werden :



(E = Enzym; M = α_2 -M; M' = durch Enzymeinwirkung modifiziertes α_2 -M; M^O = α_2 -M nach Konformationsänderung).

Folgende Schemazeichnung nach HEIMBURGER (11) soll die beschriebene Reaktion des α_2 -M mit Proteasen verdeutlichen :



(P = Protease; aS = aktive Seite)

Abb.3 Schema der vermutlichen alpha₂-M - Proteasen - Reaktion

V. Säurestabile Proteaseninhibitoren

1. Säurestabile Proteaseninhibitoren in Serum und Harn

Bereits im Jahre 1953 und 1955 haben Untersuchungen von PEANASKY und LASKOWSKY (40) sowie von SHULMAN (57) gezeigt, daß im Überstand von deproteinisiertem menschlichem Serum immer noch etwa 3 % der insgesamt im Blut vorhandenen Aktivität verbleiben. Aus dem Überstand ließ sich ein säurestabiler Proteaseninhibitor mit einem geschätzten Molekulargewicht von 17 000 isolieren.

Auch im menschlichen Urin konnte schon vor längerer Zeit ein säurestabiler, niedermolekularer Trypsininhibitor nachgewiesen werden, den ASTRUP "Mingin" nannte (2).

Inzwischen gelang es HOCHSTRASSER und Mitarbeitern (19), nicht nur aus Enteiweißungsüberstand von Humanserum, sondern auch aus nativem Serum durch Affinitätschromatographie zwei säurestabile Proteaseninhibitoren zu isolieren, deren Molekulargewicht sie gemäß Gelfiltration auf 22 000 und 44 000 einstuften. Beide Inhibitoren zeigten eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung. Es konnte daher angenommen werden, daß der höhermolekulare Inhibitor jeweils ein Dimeres des niedermolekularen Hemmstoffs ist. Beide Inhibitoren zeigten eine immunologische Kreuzreaktion mit dem Inter-alpha-Trypsininhibitor des Serums und eine Konzentrationsabhängigkeit vom Inter-alpha-Trypsininhibitorspiegel im Serum.

Auch aus Harn nach Enteiweißung isolierten HOCHSTRASSER und Mitarbeiter (18) durch Affinitätschromatographie zwei säurestabile Inhibitoren, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung, in dem durch Gelfiltration ermittelten Molekulargewicht (22 000 und 44 000), in ihren immunologischen Kreuzreaktionen mit dem Inter-alpha-Trypsininhibitor sowie in ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit mit den beiden säurestabilen Serum-inhibitoren identisch waren (17).

Bei weiteren Untersuchungen darüber, ob die säurestabile antiproteolytische Aktivität in Serum und Harn auch physiologischerweise auf diese Inhibitoren zurückgeht, fanden HOCHSTRASSER und Mitarbeiter (12, 16), daß im physiologischen Milieu von Serum und Harn nur ein säurestabiler Inhibitor mit einem Molekulargewicht von 34 000 vorkommt. Gelfiltration ergibt aufgrund des großen Kohlenhydratanteils einen scheinbaren Wert von 65 000. Der wirkliche Wert von 34 000 errechnet sich

aus der spezifischen Aktivität des Inhibitors von 650 ImU/mg Inhibitorprotein (ImU = Trypsin-Inhibitor-Millieinheit). Es ist gelungen, diesen Inhibitor aus dem Inter-alpha-Trypsininhibitor (ITI) durch Inkubation mit Pankreaskallikrein freizusetzen. Von diesem freigesetzten Inhibitor kann durch Trypsinbehandlung ein weiterer Inhibitor mit dem Molekulargewicht 17 000 (scheinbares Molekulargewicht nach Gelfiltration 22 000) freigesetzt werden, der mit dem früher isolierten Inhibitor mit dem Molekulargewicht 22 000 identisch ist, aber physiologischerweise nicht vorkommt. Die gleiche Freisetzung gelingt durch Trypsinbehandlung des ITI (12, 16).

Nach all dem ist anzunehmen, daß der säurestabile Serum- und Harninhibitor mit dem Molekulargewicht von 34 000 aus dem säurelabilen ITI in vivo durch eine limitierte Proteolyse freigesetzt wird, wobei das freisetzende proteolytische Enzym (möglicherweise Kallikrein) nicht durch den vollständigen ITI, aber auch nicht durch den säurestabilen Inhibitor gehemmt wird (12, 16). Damit liegt erstmalig ein Beispiel dafür vor, daß auch Proteaseninhibitoren eine Vorstufe, einen "precursor" haben können.

Wie alle bisher bekannten Serum - Proteaseninhibitoren ist auch der säurestabile Inhibitor in Serum und Harn ein Glykoprotein. Der Kohlenhydratanteil dürfte größtenteils in einem für die Hemmaktivität nicht wesentlichen Teil des Inhibitor-moleküls liegen, da bei Neuraminidasebehandlung die inhibitorische Aktivität unverändert bleibt, die elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit aber stark abnimmt (12).

Zur Hemmspezifität ist zu bemerken, daß dieser Inhibitor 1 aktives Zentrum besitzt und im Gegensatz zum Inter - alpha - Trypsininhibitor, der nur Trypsin hemmt, außer Trypsin auch Chymotrypsin und Plasmin hemmen kann, wenn auch die Trypsinhemmung im Vordergrund steht. Mit der Freisetzung aus dem "precursor" ist also eine Erweiterung des Hemmspektrums verbunden (12, 16).

Die Konzentration des säurestabilen Inhibitors beträgt im Serum 5 - 10 ImU/ml, im Harn 8 - 10 ImU/ml. Der Serumspiegel steigt bei Nephropathien ganz erheblich und früher als der Serumkreatininspiegel an (8, 17). Dies und die Identität von Serum- und Harninhibitor weisen darauf hin, daß dieser säurestabile Inhibitor durch die Niere ausgeschieden werden kann. Der Inter - alpha - Trypsininhibitor mit seinem Molekulargewicht von 180 000 ist dagegen sicherlich ein zugroßes Molekül, um glomerulär filtriert werden zu können. Aufgrund der Beobachtung der Konzentration des säurestabilen Inhibitors im Serum kann möglicherweise künftig der Beginn einer Abstoßungskrise nach Nierentransplantation noch vor einem Kreatininanstieg erkannt werden. Da aber ein erhöhter Serumspiegel nicht nur durch Verminderung der glomerulären Filtration, sondern auch durch eine vermehrte Freisetzung aus dem "precursor" verursacht sein kann, ist dafür Voraussetzung, daß das freisetzende Enzym erkannt wird (8, 16).

2. Der säurestabile Proteaseninhibitor in Sekreten des oberen Respirationstrakts

HOCHSTRASSER und Mitarbeiter (15, 20 - 23, 44, 46) fanden in menschlichem Nasen- und Bronchialsekreten einen niedermolekularen, säurestabilen Proteaseninhibitor mit dem Molekulargewicht von ca. 13 000, dessen

Vorstufe möglicherweise ein Inhibitor mit dem Molekulargewicht von etwa 20 000 ist. Es kann als sicher angenommen werden, daß dieser Sekretinhibitor strukturell verschieden ist von dem säurestabilen Inhibitor (und dessen Derivat) in Serum und Harn.

Allerdings weist auch der säurestabile Sekretinhibitor des oberen Respirationstrakts eine Antigenverwandtschaft mit dem ITI auf : Er zeigt ebenfalls eine immunologische Kreuzreaktion mit diesem Inhibitor (21). Wahrscheinlich geht auch der Sekretinhibitor aus demjenigen Teil des ITI hervor, der nach der Abspaltung des säurestabilen Serum- und Harninhibitors verbleibt. Die Freisetzung könnte durch einen aktiven Prozeß der Schleimhaut mit anschließendem Transport in das Bronchial- oder Nasensekret erfolgen (18); neuere Erkenntnisse sprechen jedoch mehr für die Mitwirkung eines Enzyms (möglicherweise Kallikrein) (12). Überraschenderweise konnte bei Bronchitikern eine im Vergleich zu Gesunden erhöhte Konzentration des ITI festgestellt werden, obwohl bei solchen Patienten ein erhöhter Verbrauch des Sekretinhibitors zu erwarten ist und damit die Konzentration des "precursors" im Serum sinken müßte. Möglicherweise kommt es zu einer so starken reaktiven Überproduktion des ITI, daß seine Konzentration im Serum ansteigen kann.

Die beiden säurestabilen Sekretinhibitoren besitzen wahrscheinlich nur ein aktives Zentrum, das durch einen Argininrest gekennzeichnet ist (12, 44). Ihr Hemmspektrum verdient besondere Beachtung : Neben Trypsin und Chymotrypsin hemmen sie auch leukozytäre Proteasen (15). Da gerade der obere Respirationstrakt besonders infektionsgefährdet ist, im Fall einer Infektion vermehrt Leukozyten einwandern und somit die Zahl der Proteasen aus zerfallenden Leukozyten zunimmt, erfüllen diese Inhibitoren eine wichtige Schutzfunktion im Bereich der oberen Luftwege.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

I. Auswahl und Beschreibung des Untersuchungsmaterials

Für die Untersuchungen wurden Ohrsekrete von Patienten gesammelt, die an einer chronischen Mittelohrentzündung in der Form der Schleimhauteiterung oder der Cholesteatomeiterung erkrankt waren und eine Ohrsekretion aufwiesen.

Dabei kam es darauf an, in möglichst vielen Fällen von jeweils demselben Patienten sowohl eine präoperative als auch eine postoperative Sekretprobe zur Verfügung zu haben, um die Inhibitorkonzentrationen entsprechend vergleichen zu können. Aus verschiedenen Gründen war es oft nicht möglich, solche "Sekretpaare" zu erhalten. Es gelang bei 19 Patienten, davon 10 mit Cholesteatomeiterung, 9 mit Schleimhauteiterung.

Darüber hinaus untersuchten wir noch einzelne prä- oder postoperative Sekretproben, und zwar 5 präoperative und 4 postoperative Proben bei Cholesteatomeiterung sowie 6 präoperative und 5 postoperative Proben bei Schleimhauteiterung. Insgesamt gelangten also 58 Sekretproben zur Untersuchung.

II. Vorbereitung der Sekretproben

Die Abstrichtupfer wurden mit je 3 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zentrifugiert. Die Überstände wurden noch zusätzlich filtriert und bildeten dann die Versuchslösungen (Näheres siehe experimenteller Teil).

III. Ermittlung des Gesamtproteingehaltes jeder Sekretprobe

1. Zielsetzung und methodisches Vorgehen

Es erschien wünschenswert, die Inhibitorkonzentrationen nicht pro ml Sekretlösung (die ja erst durch Aufschwemmen der Wattetupfer hergestellt wurde und physiologisch in dieser Form nicht vorkommt), sondern pro mg des in der Sekretprobe enthaltenen Gesamtproteins anzugeben. Eine Konzentrationsangabe dieser Art dürfte die tatsächlichen in vivo - Verhältnisse am ehesten wiedergeben.

Die Untersuchung jeder Sekretprobe begann also damit, daß wir die Gesamtmenge der verschiedensten Proteine bestimmten, die in ihr enthalten war. Dies geschah mit Hilfe der Ninhydrinreaktion, auf die im experimentellen Teil näher eingegangen wird. Um im Hinblick auf die Empfindlichkeit dieses Verfahrens möglichst genaue Ergebnisse zu erzielen, bestimmten wir von jeder Sekretlösung und von einer Lösung, deren Proteinkonzentration bekannt war, jeweils vier Werte und bildeten dann Durchschnittswerte.

2. Ergebnisse

Die in den Ohrsekretlösungen enthaltenen Proteinmengen waren - wie zu erwarten war - sehr unterschiedlich, zumal ja nicht selten die Sekretprobe eines Patienten auf mehreren bei ihm vorgenommenen Sekretabstrichen beruhte und natürlich unterschiedliche Sekretmengen an den Tupfern haften blieben. Die Werte für die Gesamtproteinmengen reichten von 0,3690 mg bis 4,73349 mg pro ml Sekretlösung.

IV. Ermittlung der Konzentrationen an α_1 - Antitrypsin und α_2 - Makroglobulin in den Sekretproben

1. Methodisches Vorgehen

Der quantitative Nachweis dieser beiden Inhibitoren erfolgte durch den Mancini - Test auf M - Partigen^R - Immundiffusionsplatten. Die ersten drei Auftragsstellen jeder Platte beschickten wir mit drei Verdünnungsstufen von Protein - Standard - Plasma (für die Bestimmung von α_1 -AT) bzw. mit drei Lösungen von Protein - Standard - Serum B (für die Bestimmung von α_2 -M), und zwar pro Auftragsstelle mit je 5 μ l. Die α_1 -AT-Konzentration im Protein - Standard - Plasma und die drei Konzentrationen des α_2 -M in den drei Lösungen von Protein - Standard - Serum B waren bekannt (Näheres siehe experimenteller Teil).

Die restlichen 9 Auftragsstellen einer jeden Platte füllten wir mit den zu untersuchenden Sekretlösungen. Da ja die Inhibitorkonzentrationen der Sekretproben unbekannt waren, andererseits aber die Bildung von Präzipitatringsen bei möglichst vielen Proben angestrebt wurde, verwendeten wir pro Sekretlösung 3 Auftragsstellen und füllten sie mit jeweils 6,8 und 10 μ l. Auf einer einzelnen Platte konnten also drei verschiedene Sekretproben auf den Gehalt an α_1 -AT oder an α_2 -M untersucht werden. Nachdem die vom Herstellerwerk vorgestanzten Auftragsstellen nur 5 μ l fassen, füllten wir die Sekretlösungen nur nach und nach ein, so daß bereits ein Teil der Lösung in die Agarschicht diffundieren konnte, bevor die restliche Menge aufgetragen wurde. Auf diese Weise konnte ein Überlaufen der Auftragsstellen zuverlässig verhindert werden. Insgesamt beschickten wir 40 Partigenplatten.

An den pro Sekretprobe vorgesehenen drei Auftragsstellen bildeten sich maximal drei Präzipitatrings (Hemmkreise), deren Durchmesser quadriert wurden. Um die ersten drei Auftragsstellen jeder Platte, die mit den Proteinstandardlösungen bekannter α_1 -AT - bzw. α_2 -M - Konzentration gefüllt worden waren, bildeten sich ebenfalls drei Präzipitationsringe. Aus deren quadrierten Durchmessern, den drei bekannten Konzentrationen der Standardlösungen und den von den Sekretproben stammenden quadrierten Hemmkreisdurchmessern berechneten wir die Konzentrationen der beiden Inhibitoren in den Sekretproben. Auf diese Weise konnten pro Sekretprobe maximal 9 Werte für den α_1 -AT - Gehalt und 9 Werte für den α_2 -M - Gehalt ermittelt werden, die natürlich geringfügig voneinander abwichen. Die Konzentrationswerte ergaben sich zunächst in $\mu\text{g}/\text{ul}$ bzw. mg/ml Sekretlösung und wurden dann, da ja die in einem ml enthaltene Gesamtproteinmenge vorher ermittelt worden war, auf mg pro mg Gesamtprotein umgerechnet. Daraufhin bildeten wir Durchschnittswerte.

Es ist aber zu beachten, daß sich die Molekulargewichte der beiden Inhibitoren ganz grundlegend unterscheiden : das Molekulargewicht von α_2 -M ist etwa 12,5 mal größer als das von α_1 -AT, wenn man gemäß den Ausführungen im theoretischen Teil für α_2 -M ein Molekulargewicht von 725 000 und für α_1 -AT ein Molekulargewicht von 58 000 annimmt. Für Konzentrationsvergleiche erscheint es daher zutreffend, den Gehalt der Proben an α_1 -AT und α_2 -M in erster Linie in mMol pro mg Gesamtprotein anzugeben und bei der Umrechnung die genannten Molekulargewichte zugrunde zu legen. Die folgende Abbildung 4 zeigt deutlich den Unterschied zwischen den beiden Arten der Konzentrationsangabe.

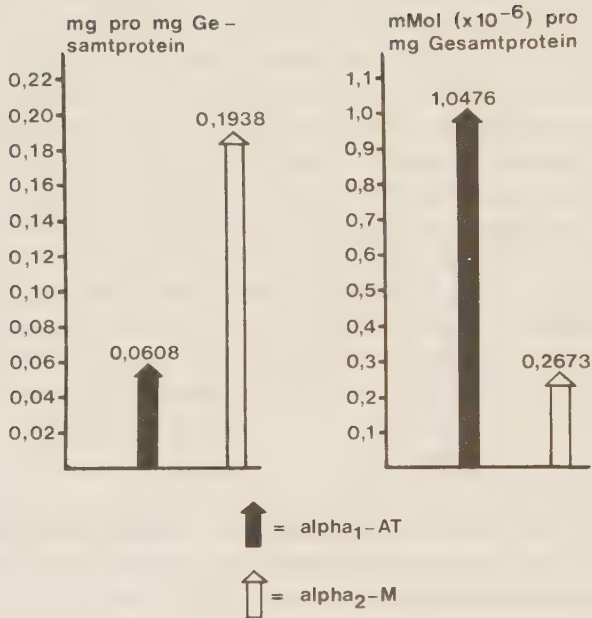


Abb. 4 : Beispiel für die unterschiedliche Relation der Konzentrationen von α_1 -AT und α_2 -M je nach Angabe in mg pro mg Gesamtprotein (links) oder in mMol pro mg Gesamtprotein (rechts). (Angegeben sind die Durchschnittskonzentrationen aller postoperativen Proben von Schleimhauteiterungen).

2. Ergebnisse

a) α_1 -AT - Konzentrationen

In einer präoperativen und einer postoperativen Probe von Schleimhauteiterungen sowie in drei präoperativen und einer postoperativen Probe von Cholesteatomeiterungen konnten wir α_1 -AT nicht nachweisen. Dafür kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Es fällt zunächst auf, daß die Gesamtproteinmengen dieser Proben niedrig waren (0,3690, 0,3760, 0,50565, 1,0985 und 1,1070 mg pro ml Sekretlösung); wenn gleichzeitig die Anteile des α_1 -AT am Gesamtprotein sehr gering waren (etwa in Verbindung mit einem niedrigeren Serumspegel), könnten die α_1 -AT - Konzentrationen zu gering gewesen sein, um auf den Partigenplatten nachgewiesen werden zu können.

Für die fehlende Nachweisbarkeit des Inhibitors in diesen Fällen könnte aber auch die Art der festgestellten bakteriellen Keimflora ursächlich sein. Zwar konnten wir in anderen Proben mit der gleichen Bakteriologie durchaus die α_1 -AT - Konzentrationen bestimmen (vgl. Gesamttabelle S. 62 ff). Aber aus der Bakteriologie geht ja nicht das Ausmaß des bakteriellen Befalls und der bakteriellen Proteasenproduktion hervor. Da angenommen wird (38), daß die Proteasen des *Pseudomonas aeruginosa* (*pyocyanea*), der in allen diesen sechs Fällen an der Keimflora beteiligt war, α_1 -AT abbauen können, besteht die Möglichkeit, daß ein im Vergleich zu anderen Sekreten extrem hoher Befall mit diesem Bakterium zum Absinken des α_1 -AT - Gehaltes auf nicht mehr nachweisbare Mengen geführt hat.

Dagegen dürfte die Komplexbildung des Inhibitors mit Proteasen nicht ursächlich sein; denn auch solche Komplexe bleiben auf den Partigenplatten nachweisbar.

Die übrigen 52 Sekretproben weisen sowohl präoperativ als auch postoperativ eine große Streubreite in den α_1 -AT - Konzentrationen auf (vgl. Abbildungen 5 und 6) :

Cholesteatomeiterung :

$0,34465 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,01999 mg) bis $1,76206 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,1022 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 5,1-fachem) bei präoperativen Proben,

$0,46327 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,02687 mg) bis $2,2374 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,12977 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 4,8-fachem) bei postoperativen Proben.

Schleimhauteiterung :

$0,36551 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,0212 mg) bis $1,75465 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,10177 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 4,8-fachem) bei präoperativen Proben,

$0,45275 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,02626 mg) bis $2,42068 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,14040 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 5,3-fachem) bei postoperativen Proben.

Diese Streubreiten könnten ihre Ursachen in der verschiedenartigen Schwere und Verlaufsform der Mittelohreiterungen bei den einzelnen Patienten haben, denn damit dürfte eine verschieden hohe proteolytische Aktivität verbunden sein, wie bereits von KASTENBAUER und Mitarbeitern (14, 30) in entzündlichen Ohrsekreten bei chronischen Schleimhaut- und Cholesteatomeiterungen festgestellt wurde. Das bedeutet, daß ein verschieden starker proteolytischer Abbau des α_1 -AT erfolgt und möglicherweise deshalb die Inhibitorkonzentration schwankt.

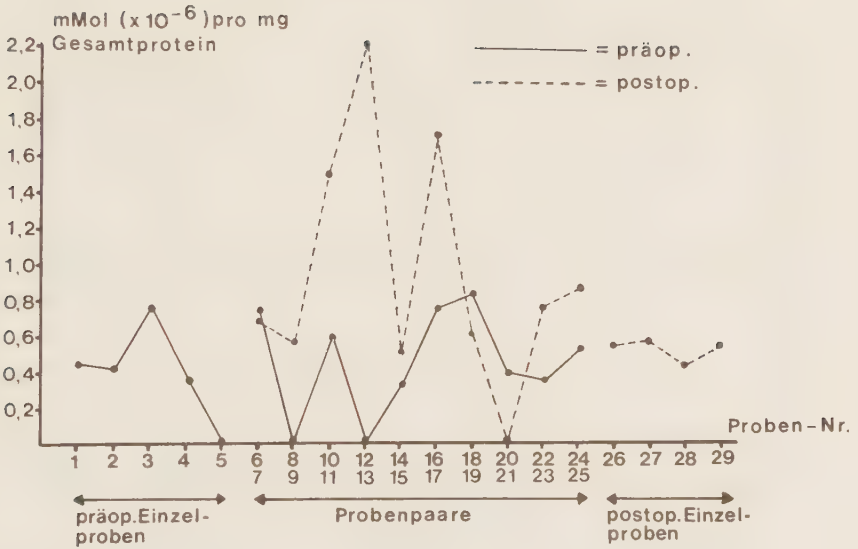


Abb. 5 : Alpha₁-AT - Konzentrationen sämtlicher prä- und postoperativen Sekretproben von Cholesteatom-eiterungen (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten).

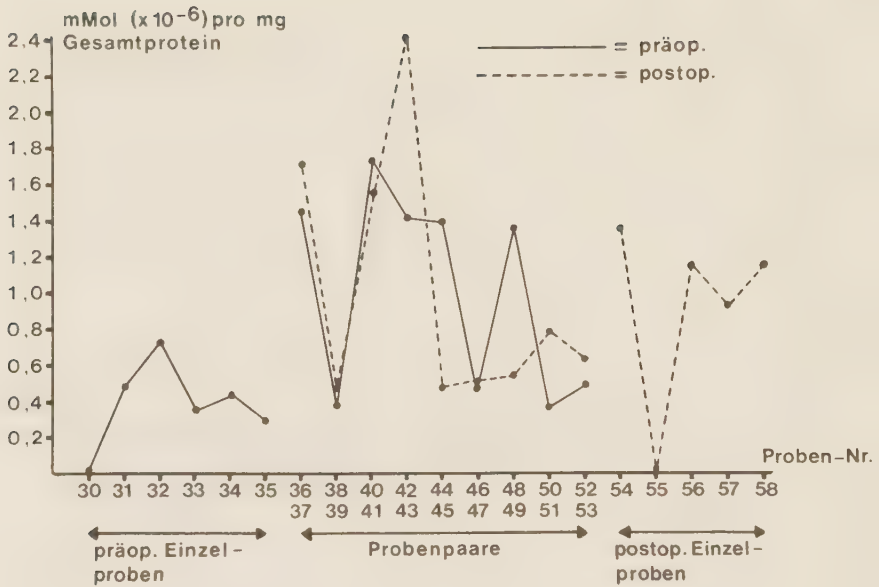


Abb. 6 : Alpha₁-AT - Konzentrationen sämtlicher prä- und postoperativen Sekretproben von Schleimhauteiterungen (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten).

Auch eine verschieden stark ausgeprägte Beteiligung von *Pseudomonas pyocyanea* an der pathogenen Keimflora könnte für die Streubreite ursächlich sein, da dessen Proteasen vermutlich - wie schon erwähnt - α_1 -AT abbauen. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß die Sekretproben, deren Bakteriologie dieses Bakterium nicht aufwies, durchwegs mehr α_1 -AT enthielten als die anderen Proben (vgl. Gesamttabelle S. 62 ff).

Sicherlich spielt auch die normale Streubreite der Serumkonzentration des α_1 -AT eine Rolle; sie reicht allerdings nur bis zum 2-fachen Wert (200 - 400 mg/100 ml).

Der Durchschnittswert der α_1 -AT - Konzentration aller präoperativen Sekretproben beträgt (vgl. Abb. 7) :

bei Cholesteatomeiterung $0,5170 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,02999 mg) pro mg Gesamtprotein,

bei Schleimhauteiterung $0,7686 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,04458 mg) pro mg Gesamtprotein.

Die postoperativen Sekretproben weisen folgende α_1 -AT - Durchschnittswerte auf :

bei Cholesteatomeiterung $0,9134 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,05298 mg) pro mg Gesamtprotein,

bei Schleimhauteiterung $0,0475 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,006076 mg) pro mg Gesamtprotein.

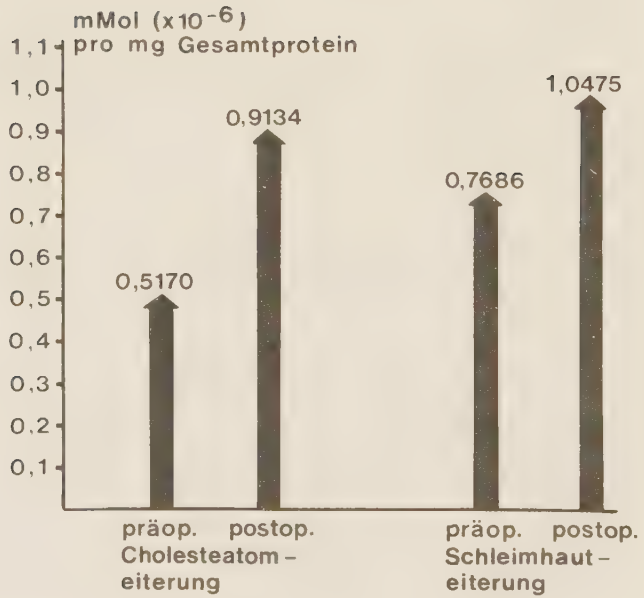


Abb. 7 : Durchschnittswerte der α_1 -AT - Konzentrationen in prä- und postoperativen Sekretproben von Cholesteatomeiterungen (linke Bildhälfte) und von Schleimhauteiterungen (rechte Bildhälfte). Es sind alle Sekretproben (auch die Einzelproben) berücksichtigt.

Bei den Fällen, in denen vom Patienten zugleich ein präoperativer und ein postoperativer Sekretabstrich zur Verfügung stand, weisen in 70 % der "Sekretprobenpaare" von Cholesteatomeiterungen und in 66,6 % der "Probenpaare" von Schleimhauteiterungen die postoperativen Sekretproben einen höheren α_1 -AT - Gehalt als die präoperativen Proben auf. Dies zeigt sich auch in den Durchschnittswerten dieser Probenpaare (Abb. 8) :

präoperative Proben von Probenpaaren : $0,6252 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,36265 mg) pro mg Gesamtprotein bei
Cholesteatomeiterungen und $0,9531 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,05528 mg) pro mg Gesamtprotein bei
Schleimhauteiterungen

postoperative Proben von Probenpaaren : $1,0584 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,06139 mg) pro mg Gesamtprotein bei
Cholesteatomeiterungen und $1,1086 \times 10^{-6}$ mMol
(= 0,06430 mg) pro mg Gesamtprotein bei
Schleimhauteiterungen.

Auch die auf der vorhergehenden Seite genannten Durchschnittswerte aller (also einschließlich der Einzelproben) präoperativen und postoperativen Sekretproben bestätigen eindeutig diese Tendenz.

Der postoperativ höhere α_1 -AT - Gehalt ist verständlich, da in der postoperativen Phase außer den bakteriellen und leukozytären Proteasen zusätzlich noch diejenigen Proteasen, die durch die bei der Operation zwangsläufig erfolgenden Gewebsschädigung freigesetzt werden, abgebunden werden müssen. Außerdem werden bei der Operation auch Gefäße eröffnet, so daß α_1 -AT auf dem Blutweg eingeschwemmt werden kann.

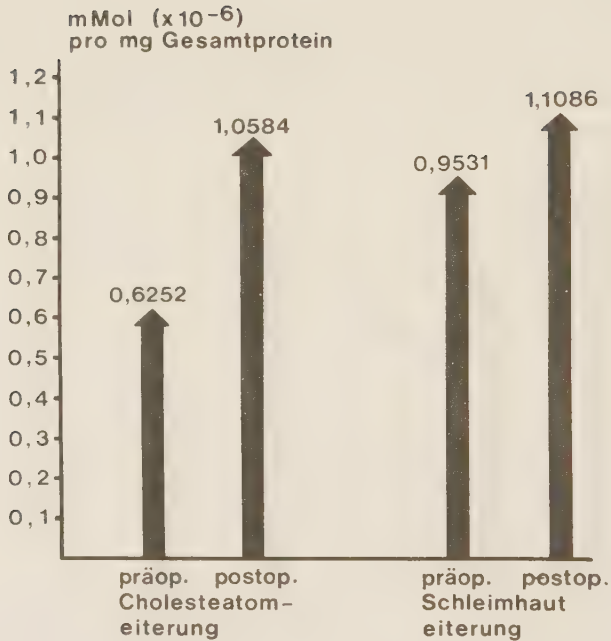


Abb. 8 : Durchschnittswerte der α_1 -AT - Konzentrationen in prä- und postoperativen Sekretproben der Probenpaare (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten) von Cholesteatomeiterungen (linke Bildhälfte) und von Schleimhauteiterungen (rechte Bildhälfte).

Die letztgenannte Möglichkeit fällt aber sicherlich nicht so stark ins Gewicht, da α_1 -AT ohnehin sehr leicht aus dem Blutplasma in den extravaskulären Raum übertreten kann (s. oben).

b) α_2 -M - Konzentrationen

Dieser Inhibitor war öfters als α_1 -AT nicht nachweisbar : bei 6 von 15 präoperativen und in 3 von 14 postoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen sowie in 6 von 15 präoperativen und in 2 von 14 postoperativen Proben von Schleimhauteiterungen bildeten sich keine Präzipitationsringe auf den Partigen^R - Platten. Auch hier dürfte ursächlich sein, daß die mit dem Abstrich aufgenommenen Gesamtproteinmengen zu gering waren (meist unter 1 mg/ml Sekretlösung). Interessanterweise konnten wir bei 3 Patienten weder in der präoperativen noch in der postoperativen Probe α_2 -M nachweisen. Zusätzlich sind noch die ohnehin geringen Konzentrationen dieses Inhibitors im Vergleich zum α_1 -AT (bei Angabe in mMol/mg Gesamtprotein) zu bedenken; darüber wird noch berichtet.

In den übrigen 41 Sekretproben ergeben sich folgende Streubreiten des α_2 -M - Gehaltes (vgl. Abbildungen 9 und 10) :

Cholesteatomeiterung :

$0,09813 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,07115 mg) bis $0,36013 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,2611 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 3,6-fachem) bei präoperativen Proben,

$0,1314 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,09527 mg) bis $0,55248 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,41155 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 4,2-fachem) bei postoperativen Proben.

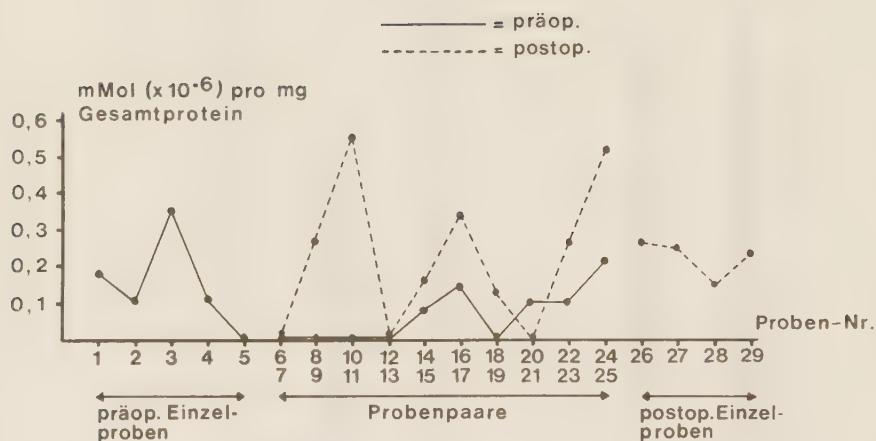


Abb. 9 : Alpha₂-M - Konzentrationen sämtlicher prä- und postoperativen Sekretproben von Cholesteatom-eiterungen (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten).

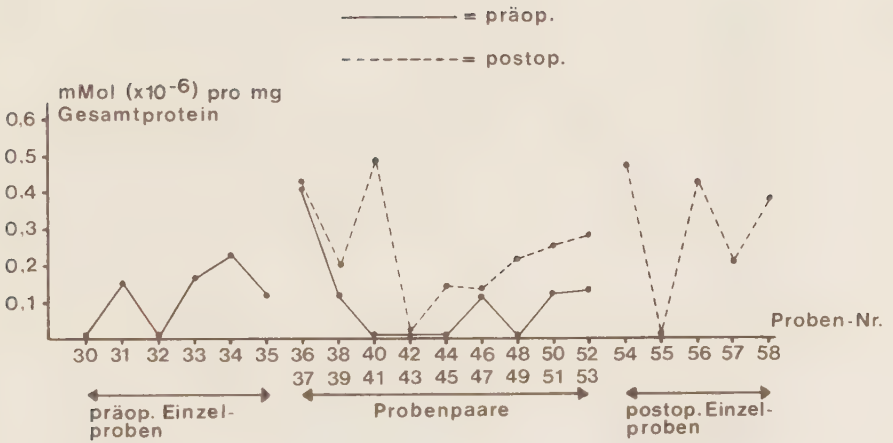


Abb. 10 : Alpha₂-M - Konzentrationen sämtlicher prä- und postoperativen Sekretproben von Schleimhauteiterungen (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten).

Schleimhauteiterung :

$0,12242 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,08876 mg) bis $0,48950 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,35490 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 3,9-fachem) bei präoperativen Proben,

$0,14848 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,10765 mg) bis $0,49011 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,35533 mg) pro mg Gesamtprotein (also bis zum 3,3-fachem) bei postoperativen Proben.

Diese Streubreiten liegen deutlich unter denen der α_1 -AT - Konzentrationen. Ein einleuchtender Grund dafür kann angesichts der Tatsache, daß im Plasma nicht α_1 -AT, sondern α_2 -M auch unter normalen Bedingungen die größere Streubreite aufweist, nicht gegeben werden. Immerhin kann man darin vielleicht einen kleinen Hinweis auf die Schlüsselfunktion des α_2 -M in der Körperabwehr gegen den Angriff von Proteinasen sehen.

Vergleicht man jeweils die präoperativen mit den postoperativen α_2 -M - Konzentrationen in den "Sekretprobenpaaren", dann zeigt sich weitaus deutlicher als bei α_1 -AT (nämlich in 88,8 % der Sekretpaare von Schleimhauteiterungen und in immerhin 70 % der Sekretpaare von Cholesteatomeiterungen), daß die postoperativen Proben einen höheren α_2 -M - Gehalt als die präoperativen Proben aufweisen. Besonders in den Durchschnittswerten dieser "Sekretpaare" kommt der postoperativ höhere Gehalt noch deutlicher als bei α_1 -AT zum Ausdruck (vgl. Abb. 11) :

präoperative Proben von Probenpaaren : $0,0705 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,05115 mg) pro mg Gesamtprotein bei Cholesteatomeiterungen und $0,1050 \times 10^{-6}$ mMol (= 0,07617 mg) pro mg Gesamtprotein bei Schleimhauteiterungen,

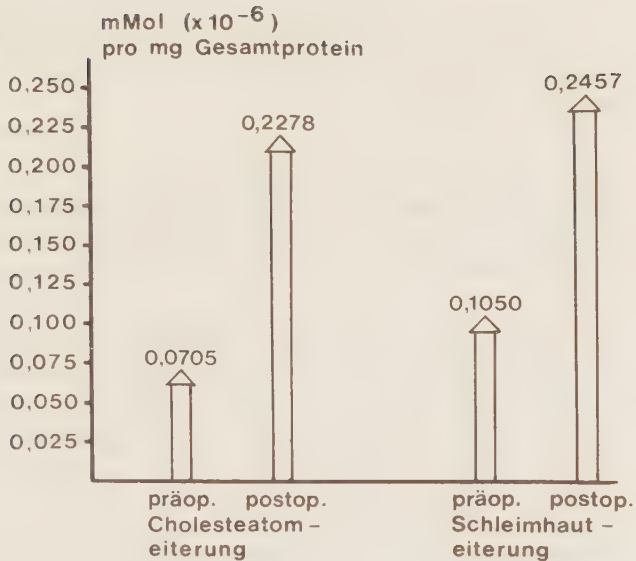


Abb. 11 : Durchschnittswerte der α_2 -M - Konzentrationen in prä- und postoperativen Sekretproben der Probenpaare (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten) von Cholesteatom-eiterungen (linke Bildhälfte) und von Schleimhauteiterungen (rechte Bildhälfte).

postoperative Proben von Probenpaaren : $0,2278 \times 10^{-6}$ mMol (= $0,16517$ mg) pro mg Gesamtprotein bei Cholesteatomeiterungen und $0,2457 \times 10^{-6}$ mMol (= $0,17814$ mg) pro mg Gesamtprotein bei Schleimhauteiterungen.

Auf einen postoperativ höheren α_2 -M - Gehalt weisen auch die Durchschnittswerte aller Sekretproben (also einschließlich der Einzelproben) hin. Diese betragen (vgl. Abb. 12) :

bei präoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen $0,1004 \times 10^{-6}$ mMol (= $0,07280$ mg) pro mg Gesamtprotein;
bei präoperativen Proben von Schleimhauteiterungen $0,1095 \times 10^{-6}$ mMol (= $0,07944$ mg) pro mg Gesamtprotein;

bei postoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen $0,2150 \times 10^{-6}$ mMol (= $0,15592$ mg) pro mg Gesamtprotein;
bei postoperativen Proben von Schleimhauteiterungen $0,2673 \times 10^{-6}$ (= $0,19383$ mg) pro mg Gesamtprotein.

Der postoperativ höhere α_2 -M - Gehalt kann auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden. Zunächst müssen in der postoperativen Heilphase zusätzlich Proteasen abgebunden werden, die von der bei der Operation erfolgten Gewebsschädigung herrühren. Hierfür ist es von Bedeutung, daß auch noch nach erfolgter Operation eine erhöhte Gefäßpermeabilität das Übertreten von α_2 -M in den extravaskulären Raum möglich macht, da die Entzündungsreaktion erst im Verlauf von mehreren Wochen nach der Operation abklingt. Vor allem aber werden während der Operation unweigerlich Endstromgefäße eingerissen und dadurch erhebliche Mengen an α_2 -M auf dem Blutweg eingeschwemmt, die noch einige Zeit nach der Operation an Ort und Stelle verbleiben

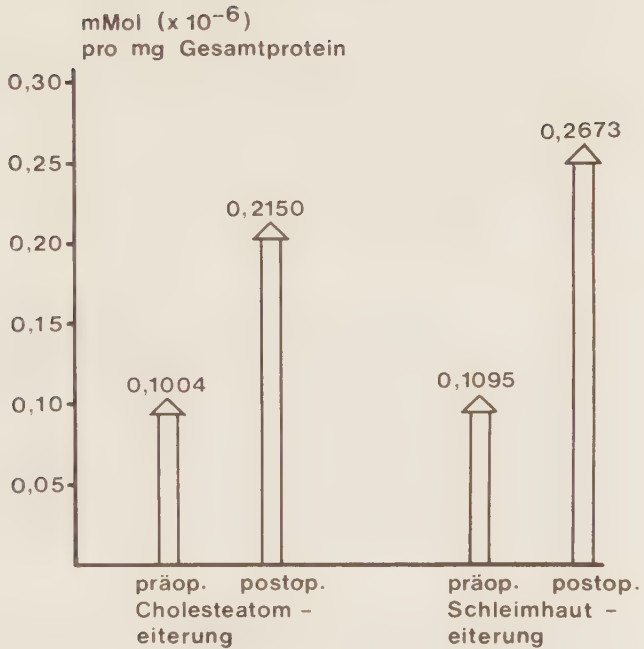


Abb. 12 : Durchschnittswerte der α_2 -M - Konzentrationen in prä- und postoperativen Sekretproben von Cholesteatomeiterungen (linke Bildhälfte) und von Schleimhauteiterungen (rechte Bildhälfte). Es sind alle Sekretproben (auch die Einzelproben) berücksichtigt.

und aus dem traumatisierten Gewebe nachfließen. Da allerdings der postoperative Sekretabstrich in der Regel erst nach etwa 10 Tagen nach der Operation durchgeführt werden konnte, ist nur mehr ein Teil des eingeschwemmten α_2 -M nachweisbar, so daß der Unterschied zwischen prä- und postoperativem Gehalt kleiner erscheint.

Natürlich wird mit α_2 -M auch gleichzeitig α_1 -AT eingeschwemmt. Für die α_1 -AT - Konzentration spielt dies aber, wie schon erwähnt, wegen der ohnehin sehr guten Gefäßpermeabilität des α_1 -AT keine große Rolle.

Dem postoperativ höheren α_2 -M - Gehalt kommt angesichts der Vielzahl der proteolytischen Enzyme, die von diesem Inhibitor gehemmt werden können, große Bedeutung zu. Beispielsweise scheint α_2 -M der einzige Hemmstoff gegen die äußerst aktiven und pathogenen Proteasen des *Pseudomonas aeruginosa* (s. Einleitung) zu sein (24), der bei unseren Untersuchungen gemäß der angegebenen Bakteriologie an der Keimflora sehr häufig beteiligt war.

Der postoperativ höhere α_2 -M - Gehalt gewinnt noch aus weiteren Gründen Bedeutung : Es wurde schon weiter oben festgestellt, daß α_2 -M, im Gegensatz zu α_1 -AT, die Proteasen von *Staphylococcus aureus* und *Proteus vulgaris* in menschlichem Sputum hemmen kann (16). Die Annahme liegt nahe, daß α_2 -M diese Aufgabe auch bei Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen übernehmen kann, die nicht selten einen Befall mit diesen Bakterienarten aufweisen (s. Bakteriologie in der Gesamttabelle S. 62 ff).

Aus diesen Gründen wird die Meinung vertreten (29), der Erfolg einer Operation bei Cholesteatom - oder Schleimhauteiterung beruhe in nicht geringem Maße darauf, daß bei der Operation ausreichende Mengen an α_2 -M eingeschwemmt werden und dadurch die Proteasen der genannten Bakterien inaktiviert werden können. Unsere Ergebnisse, nach denen die postoperativen Sekretproben einen höheren α_2 -M - Gehalt aufweisen als die präoperativen Proben, scheinen diese These zu bestätigen.

V. Ermittlung der Konzentration an säurestabilem Schleimhautinhibitor (ssI) in den Sekretproben

1. Methodisches Vorgehen

Wir enteiweißten je 1 ml der vorbereiteten (s. oben II) Sekretlösungen mit Perchlorsäure und zentrifugierten sie dann. Diese Enteiweißung bewirkt, daß andere säurelabile Inhibitoren zerstört werden. Die nach Zentrifugation im Überstand verbleibende Hemmwirkung wird also zwingend durch einen säurestabilen Inhibitor (ssI) (oder mehrere) bewirkt.

Die Enteiweißung hat aber auch zur Folge, daß der ssI aus der eventuell vorhandenen Bindung an Proteasen durch deren Denaturierung freigesetzt wird und erst dadurch aufgrund der Hemmwirkung nachgewiesen werden kann (anders als beim Nachweis von α_1 -AT und α_2 -M kann bei der Versuchsanordnung zum Nachweis des ssI nur der freie, nicht an Proteasen gebundene ssI erkannt werden).

Zur Bestimmung des Gehalts an ssI in den enteiweißten Sekretproben untersuchten wir, inwieweit die durch definierte Trypsinmengen bewirkte Spaltung von N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid (= L - BAPA) durch bestimmte Mengen der enteiweißten Sekretlösungen gehemmt wird (10). Pro Sekretprobe führten wir den Hemmversuch mit 0,1 ml, 0,2 ml und 0,5 ml enteiweißter Sekretlösung durch. Die Konzentrationsangaben erfolgen in Inhibitor-Milli-Einheiten (ImU) pro mg Gesamtprotein. 1 ImU ist diejenige Inhibitormenge, die 1 mU (Millieinheit) Trypsin zu hemmen vermag (Näheres im experimentellen Teil).

2. Ergebnisse

In einer präoperativen Sekretprobe von Schleimhauteiterung sowie in einer präoperativen und einer postoperativen Probe von Cholesteatomeiterungen konnten wir eindeutig keinen ssI nachweisen. In einer weiteren Sekretprobe (präoperativ, Schleimhauteiterung) betrug der Inhibitorgehalt lediglich 0,2290 ImU pro mg Gesamtprotein. Dieser Wert wird gleich Null gesetzt, da er zu niedrig ist, um als Nachweis für den ssI gelten zu können.

Als Ursachen für die Nichtnachweisbarkeit eines ssI in diesen vier Sekretproben können hier sicherlich nicht zu geringe Gesamtproteinmengen genannt werden; diese lagen bis auf eine Ausnahme über 1 mg/ml Sekretlösung. Auch ein Zusammenhang mit der Bakteriologie ist nicht erkennbar. Näherliegend erscheint die Beteiligung eines oder aller Faktoren, von denen gleich anschließend im Zusammenhang mit der Streubreite des Inhibitorspiegels die Rede sein wird.

In den übrigen 54 Sekretproben (= 93,1 %) schwankten die Konzentrationen an ssI (vgl. Abbildungen 13, 14) :

Cholesteatomeiterung :

o,35365 ImU bis 3,8279 ImU pro mg Gesamtprotein
bei präoperativen Proben (also bis zum 10,8-fachen),

o,31840 ImU bis 6,56976 ImU pro mg Gesamtprotein
bei postoperativen Proben (also bis zum 20,6-fachen).

Schleimhauteiterung :

o,37910 ImU bis 3,74510 ImU pro mg Gesamtprotein
bei den präoperativen Proben (also bis zum 10-fachen),

o,68428 ImU bis 4,8753 ImU pro mg Gesamtprotein
bei den postoperativen Proben (also bis zum 7,1-fachen).

Innerhalb dieser Werte ist ein ausgesprochenes Häufigkeitsmaximum nicht erkennbar. Die Streubreiten sind sehr groß, auch wenn man bedenkt, daß die Patienten auch bei normalen Verhältnissen einen sehr individuellen Inhibitorspiegel besitzen dürften. Die großen Schwankungen könnten durch die verschiedenen Schweregrade und Stadien der Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen bzw. durch die verschiedenen Stadien der postoperativen Erholungsphase zu erklären sein. Frühere Versuche (41, 45) haben gezeigt, daß sich der Gehalt an ssI in Nasensekreten im Verlauf von Nasenhaupt- und Nasennebenhöhleninfektionen ändert : Ein steiler Abfall des Inhibitorspiegels erfolgt bei Beginn des Infektes. Mit dem Abklingen der klinischen Symptome steigt der Inhibitorspiegel wieder an, in manchen Fällen zu extrem hohen Werten, während bei chronischen Verlaufsformen die Veränderungen des Inhibitorspiegels in Konzentrationsbereichen erfolgen, die niedriger sind als der Inhibitorspiegel bei Gesunden.

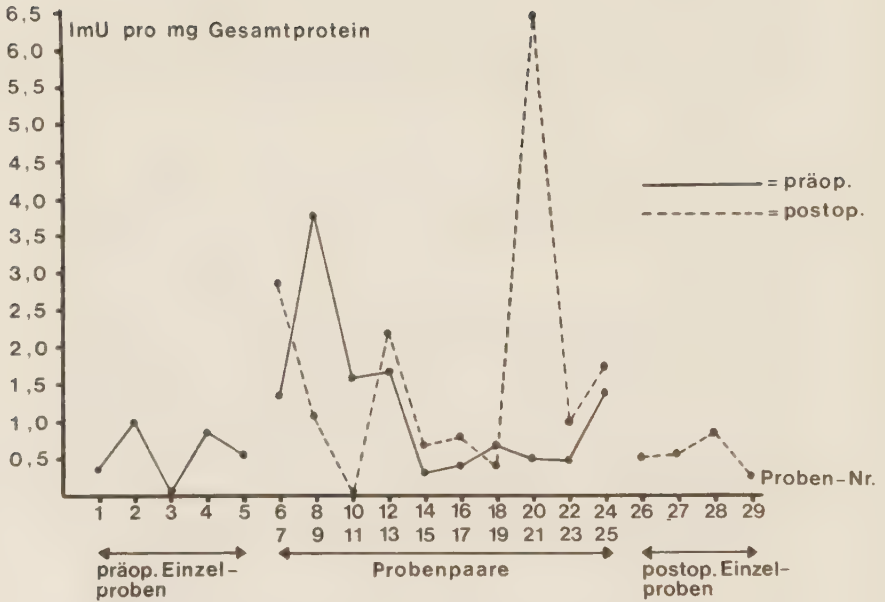


Abb. 13 : ssI - Konzentrationen sämtlicher prä- und postoperativen Sekretproben von Cholesteatom-eiterungen (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten).

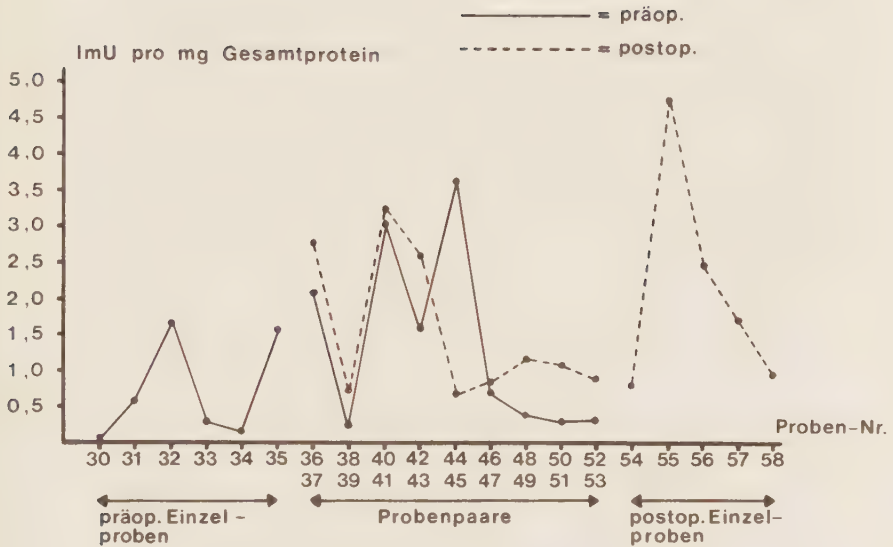


Abb. 14 : ssI - Konzentrationen sämtlicher prä- und postoperativen Sekretproben von Schleimhaut-eiterungen (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten).

Ein Zusammenhang zwischen den Schwankungen der ssI - Konzentrationen und den verschiedenen Schweregraden und Stadien der Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen ist aus verschiedenen Gründen erklärlich. Falls der ssI von einem Bruchstück des Inter-alpha-Trypsin-inhibitors (ITI) unter Mitwirkung eines Enzyms abgespalten wird (darüber wird noch zu diskutieren sein), dann könnte eine je nach Schweregrad und Stadium der Erkrankung (bzw. in der postoperativen Phase je nach Stadium der Erholung) unterschiedlich verminderte Aktivität des freisetzenden Enzyms die Schwankungen des Inhibitorspiegels (mit-)bewirken. Ein proteolytischer Abbau des Enzyms könnte zu einer so geringen Produktionsrate führen, daß ein Inhibitor nachweis nicht mehr möglich ist.

Die Schwankungen des Inhibitorspiegels könnten aber auch dadurch bewirkt werden, daß der ssI selbst oder der ITI als seine mögliche Vorstufe je nach der proteolytischen Aktivität in den Ohrsekreten verschieden stark abgebaut werden. Es ist ja bekannt, daß verschiedene Inhibitoren nur für eine begrenzte Zeit die Hemmfähigkeit behalten und dann proteolytisch abgebaut werden (45). Für diese Möglichkeit spricht, daß auch die kürzlich untersuchte (14) proteolytische Aktivität entzündlicher Ohrsekrete eine große Schwankungsbreite aufweist.

Möglicherweise wirken auch beide Faktoren zusammen, was in der vorliegenden Untersuchungsreihe vor allem für die vier Fälle mit fehlendem Gehalt an ssI in Frage kommt.

Noch ein Weiteres ist hinsichtlich der Schwankungen des Inhibitorspiegels zu bedenken : Da die ssI in Nasen- und Bronchialsekreten starke Hemmstoffe gegen leukozytäre Proteasen sind (41, 44), dürfte auch der ssI des Ohrsekrets mit diesen Proteasen reagieren, die im Verlauf einer chronischen Mittelohrentzündung durch das unterschiedliche Ausmaß des Leukozytenzerfalls in verschiedener Anzahl vorhanden sind. Durch diese Reaktion mit den Proteasen wird der ssI inaktiv, "maskiert", d.h. in diesem Zustand nicht nachweisbar. Gleichwohl kann die außerordentlich große Streubreite des Inhibitorspiegels nicht auf diese je nach Zahl der abgebundenen Proteasen unterschiedliche Maskierung zurückgeführt werden. Denn durch die Enteiweißung mit Perchlorsäure werden die Proteasen denaturiert und der ssI wird freigesetzt, so daß auch der vorher maskierte ssI in dem oben beschriebenen Hemmversuch nachgewiesen werden kann.

Die Durchschnittswerte der Konzentrationen an ssI in allen (einschließlich der Einzelproben) präoperativen Proben betragen (vgl. Abb. 15) :

bei Cholesteatomeiterung 1,0400 ImU pro
mg Gesamtprotein,

bei Schleimhauteiterung 1,16630 ImU pro
mg Gesamtprotein.

Die Gesamtheit aller postoperativen Sekretproben weist folgende Durchschnittswerte der ssI - Konzentrationen auf (vgl. Abb. 15) :

bei Cholesteatomeiterung 1,44050 ImU pro
mg Gesamtprotein,

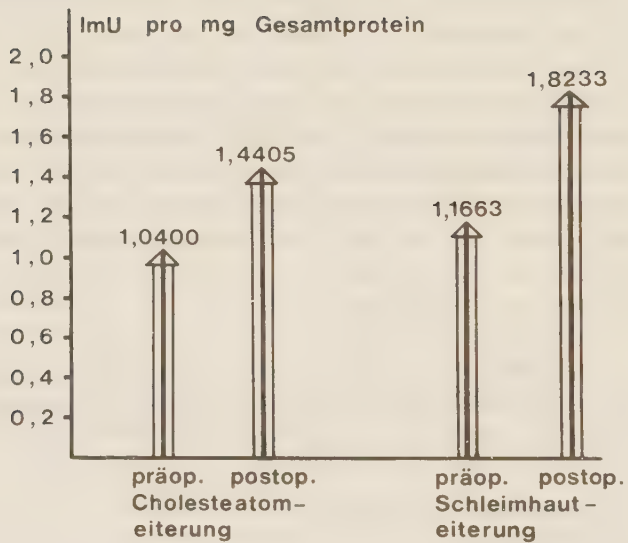


Abb. 15 : Durchschnittswerte der ssI - Konzentrationen in prä- und postoperativen Sekretproben von Cholesteatomeiterungen (linke Bildhälfte) und von Schleimhauteiterungen (rechte Bildhälfte). Es sind alle Sekretproben (auch die Einzelproben) berücksichtigt.

bei Schleimhauteiterung 1,8233o ImU pro
mg Gesamtprotein.

In den Fällen, in denen von einem Patienten sowohl ein präoperativer als auch ein postoperativer Sekretabstrich zur Verfügung stand, konnten wir bei 70 % der Sekretprobenpaare von Cholesteatomeiterungen und bei 88,8 % der "Paare" von Schleimhauteiterungen in den postoperativen Proben einen höheren Gehalt an ssI als in den präoperativen Proben nachweisen. Auch die Durchschnittswerte der ssI - Konzentrationen in diesen Probenpaaren zeigen den postoperativen Anstieg des Inhibitorspiegels; sie betragen (vgl. Abb. 16) :

bei präoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen 1,2683o ImU, von Schleimhauteiterungen 1,4274 ImU
pro mg Gesamtprotein,

bei postoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen 1,76791 ImU, von Schleimhauteiterungen 1,6o78 ImU
pro mg Gesamtprotein.

Auch die davor genannten Durchschnittswerte aller Sekretproben (also einschließlich der Einzelproben) zeigen diese Tendenz.

Der höhere Gehalt an ssI in den postoperativen Proben ist verständlich : Einerseits dürfte die proteolytische Aktivität in der postoperativen Heilungsphase etwas geringer sein als in der präoperativen Phase, so daß weder der ssI selbst noch das den ssI möglicherweise freisetzende Enzym oder die mögliche Vorstufe des ssI (vgl. Diskussion) in demselben Maße wie in der präoperativen Phase abgebaut werden dürften. Andererseits wird bei der Operation durch Eröffnung von Blutgefäßen die mögliche Vorstufe des ssI (ITI, vgl. Diskussion) vermehrt in den Mittelohrraum eingeschwemmt.

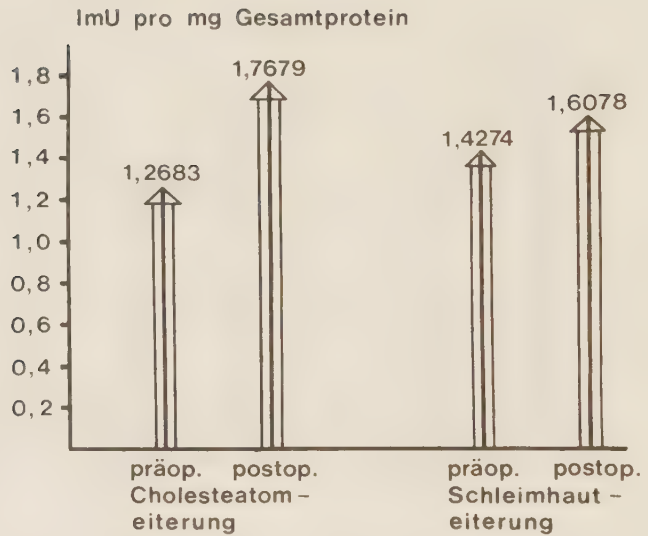


Abb. 16 : Durchschnittswerte der ssI - Konzentrationen in prä- und postoperativen Sekretproben der Probenpaare (Probenpaare = je eine prä- und postoperative Sekretprobe von jeweils denselben Patienten) von Cholesteatomeiterungen (linke Bildhälfte) und von Schleimhauteiterungen (rechte Bildhälfte).

VI. Ermittlung der Anteile von freiem und maskiertem säurestabilem Schleimhautinhibitor (ssI) in den Sekretproben

1. Zielsetzung

In entzündlich veränderten Bronchialsekreten beträgt der an Proteasen gebundene ("maskierte") Anteil an der Gesamtmenge des ssI etwa 70 %, während bei Gesunden nur etwa 30 % maskiert sind (42, 43) - ein Hinweis auf den vermehrten Anfall von leukozytären Proteasen bei Bronchitiden.

Es lag nahe, auch in den hier untersuchten Ohrsekreten das Verhältnis von freiem zu maskiertem ssI zu bestimmen. Dabei ist von folgenden Überlegungen auszugehen : An der hier nach Enteiweißung gemessenen Gesamtmenge von ssI kann vor der Enteiweißung sowohl freier als auch maskierter ssI beteiligt sein. Mißt man vor der Enteiweißung die Gesamthemmung, dann kann diese außer von α_1 -AT und α_2 -M nur von freiem ssI herrühren, da ja der maskierte ssI inaktiv ist. Also gilt : Menge an freiem ssI = Gesamthemmung vor Enteiweißung minus den zusammengerechneten Anteilen von α_1 -AT und α_2 -M. Zieht man die so berechnete Menge an freiem ssI von der nach Enteiweißung gemessenen Konzentration an ssI ab, dann erhält man den Anteil von maskiertem ssI an der Gesamtmenge des ssI (43).

2. Versuchsablauf

Von den vorbereiteten (s. oben II) Sekretlösungen verwendeten wir je 0,5 ml für die Bestimmung der Gesamthemmung vor der Enteiweißung. Wir untersuchten, inwieweit diese Sekretmenge jeweils die durch eine definierte Trypsinmenge bewirkte Spaltung von

N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid (L - BAPA) hemmen kann. Diesen Hemmtest führten wir bei 27 von den 58 Sekretproben durch (15 Proben von Cholesteatomeiterung, 12 Proben von Schleimhauteiterung, prä- und postoperativ).

3. Ergebnisse

Bei keiner der Sekretproben (gleich, ob prä- oder postoperativ) konnte eine Hemmung der von Trypsin bewirkten Spaltung des L - BAPA durch die nichtenteiweißten Sekretlösungen nachgewiesen werden. Bei 64,2 % der präoperativen Proben und 46,1 % der postoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen sowie bei 71,4 % der präoperativen und 50 % der postoperativen Proben von Schleimhauteiterungen beschleunigte die Zugabe der Sekretlösung sogar die Spaltung von L - BAPA (bei präoperativen Proben durchschnittlich um 0,04 Extinktionseinheiten, bei postoperativen Proben weitaus weniger deutlich). In fast allen diesen Sekretproben konnten wir aber mit Hilfe der Partigen^R - Platten α_1 -AT und α_2 -M sowie - nach der Enteiweißung - immer auch den ssI nachweisen.

Daraus, daß also trotz Vorhandenseins dieser Inhibitoren keine Hemmung vor der Enteiweißung zu erzielen war, folgt zunächst, daß in Ohrsekreten von Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen der gesamte ssI in vivo durch Bindung an Proteasen maskiert und inaktiv sein dürfte.

Darüber hinaus scheint aber auch das α_1 -AT und α_2 -M weitgehend durch Reaktion mit Proteasen inaktiv zu sein (für den Nachweis mit Partigen^R - Platten ist dies unerheblich).

In den Fällen, in denen wir nicht nur keine Hemmung, sondern sogar eine Beschleunigung der Spaltung des L - BAPA feststellen konnten, dürfte dieser Vorgang durch nicht abgebundene Mengen von Trypsin oder trypsin-ähnlichen Stoffen, die in den Sekretlösungen enthalten waren, bewirkt worden sein.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen vor allem in der präoperativen Phase die Proteasen das Übergewicht gegenüber dem inhibitorischen System erlangen und wohl dadurch zu einer Chronifizierung von Mittelohreiterungen beitragen können (zum Beispiel durch Abbau von Immunglobulinen, s. oben S. 2).

Aber auch in der postoperativen Phase, in der zwar, wie weiter oben beschrieben, der Gehalt an α_1 -AT, α_2 -M und ssI größer als in der präoperativen Phase ist, scheinen alle Inhibitoren zur Unschädlichmachung von Proteasen benötigt zu werden. Dabei ist zu bedenken, daß in der postoperativen Phase vermehrt Gewebsproteasen vorliegen dürften, die durch die bei der Operation erfolgenden Verletzung der Gewebe freigesetzt werden. Da wir aber bei den nichtentzündeten postoperativen Sekretlösungen zwar keine Hemmung, aber auch nur eine geringfügige Beschleunigung der Spaltung von L - BAPA feststellen konnten, kann angenommen werden, daß in der postoperativen Phase die Proteasen kaum mehr ein Übergewicht gegenüber dem inhibitorischen System haben.

VII. Bestimmung des Molekulargewichts des säurestabilen Schleimhautinhibitors im Ohrsekret (ssI)

1. Methodisches Vorgehen

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte durch Gelfiltration mit Sephadex^(R) - G 75. Da wir vermuteten, daß der ssI in den Ohrsekreten identisch ist mit dem im Bronchial- und Nasensekret vorhandenen säurestabilen Inhibitor, und da dessen Molekulargewicht mit ca. 13 000 bekannt ist (s. oben B.V.2., S. 18), verwendeten wir diesen Inhibitor als Testsubstanz. Dazu wurde Bronchialsekret enteiweißt, neutralisiert, auf ca. 15 ml eingeeengt und mit Sephadex^(R) - G 75 fraktioniert. In den Fraktionen bestimmten wir die Hemmwirkung gegen Trypsin.

Zur Gelfiltration des Ohrsekrets wurden nochmals ca. 100 Sekretabstriche von Patienten mit Cholesteatom- oder Schleimhauteiterung gesammelt, aufgeschwemmt und enteiweißt, um säurelabile Inhibitoren wie α_1 -AT und α_2 -M zu zerstören und die inhibierende Aktivität der Ohrsekretlösungen auf den ssI zurückführen zu können.

Nach anschließender Neutralisation und Einengung betrug das Auftragsvolumen ebenfalls ca. 15 ml. In den nach der Gelfiltration mit Sephadex^(R) - G 75 erhaltenden Fraktionen (je 80 Tropfen) untersuchten wir die antiproteolytische Aktivität durch den Trypsinhemmtest, deren Lokalisation im Falle der Identität der Molekulargewichte von ssI und Bronchial- und Nasensekretinhibitor an der Stelle erwartet wurde, an der auch die Hemmaktivität des Bronchialsekrets ausgetreten war.

2. Ergebnisse

Die säurestabile antiproteolytische Aktivität des Bronchialsekrets trat in den Fraktionen 26 bis 41 auf; die maximale inhibierende Aktivität betrug 87,8 ImU/ml in Fraktion 33.

In demselben Bereich, nämlich in den Fraktionen 29 bis 32, erschien die säurestabile antiproteolytische Aktivität der Ohrsekretlösungen mit einem Maximum von 1,06 ImU/ml in Fraktion 29. Die geringere Streuung ist auf die gegenüber der Testsubstanz schwächere Hemmaktivität zurückzuführen, deren niedriger Wert wiederum dadurch bedingt ist, daß die Ohrsekrete nur von ohrkranken Personen gewonnen werden können (nur dann liegt eine Sekretion vor) und deshalb der ssI teilweise abgebaut sein dürfte, während das Bronchialsekret von Personen erhalten werden kann, die im Respirationsbereich keine Erkrankung aufweisen (vgl. näher Diskussion).

Dieses Ergebnis zeigt, daß der ssI im Ohrsekret das gleiche Molekulargewicht, nämlich ca. 13 000, besitzt wie der säurestabile Inhibitor des Bronchial- und Nasensekrets und mit ihm vermutlich identisch ist.

VIII. Vergleich der Anteile der drei Inhibitoren α_1 -AT, α_2 -M und ssI an der Gesamthemmkapazität der Ohrsekrete bei Cholesteatom- und Schleimhauteiterung

1. Berechnung der Gesamthemmkapazität und der prozentualen Anteile der Inhibitoren an ihr

Unter Gesamthemmkapazität oder Gesamthemmstoffkonzentration verstehen wir die in den Ohrsekreten vorhandenen Konzentrationen von α_1 -AT, α_2 -M und

- nach Enteiweißung - von ssI. Die rechnerische Bestimmung dieser Gesamthemmkapazität und die Berechnung der Anteile der Inhibitoren an der Gesamthemmkapazität verlangen die Angabe der Inhibitorenkonzentrationen in einer einheitlichen Dimension, so daß bei unseren Ergebnissen eine Umrechnung erforderlich ist. Die entsprechend der Versuchsanordnung in mg bzw. mMol ($\times 10^{-6}$) erhaltenen Konzentrationen von α_1 -AT und α_2 -M könnten nur dann in ImU umgerechnet werden, wenn diese beiden Inhibitoren nicht in größeren Mengen in maskierter Form vorgelegen haben (43). Gerade das ist aber, wie wir schon oben erläutert haben, in den untersuchten Ohrsekreten nicht der Fall.

Dagegen können die ssI - Konzentrationen in mMol umgerechnet werden. Denn der ssI dürfte sich mit Trypsin ebenso wie der Bronchialsekretinhibitor (12) im Verhältnis 1 : 1 verbinden, so daß 1 ImU ssI auch 1 mU Trypsin hemmt. Da 1 mU Trypsin 0,1 nMol bzw. 0,1 mMol $\times 10^{-6}$ Trypsin entspricht, kann 1 ImU ssI mit 0,1 mMol $\times 10^{-6}$ ssI gleichgesetzt werden.

Die nach der so durchgeführten Umrechnung mögliche Berechnung der Gesamthemmstoffkonzentrationen ergibt folgende durchschnittliche Gesamthemmkapazität (vgl. auch Abbildungen 17 und 18) :

bei allen präoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen
 $0,7217 \times 10^{-6}$ mMol, von Schleimhauteiterungen
 $0,9947 \times 10^{-6}$ mMol pro mg Gesamtprotein,

bei allen postoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen
 $1,2724 \times 10^{-6}$ mMol, von Schleimhauteiterungen
 $1,4971 \times 10^{-6}$ mMol pro mg Gesamtprotein.

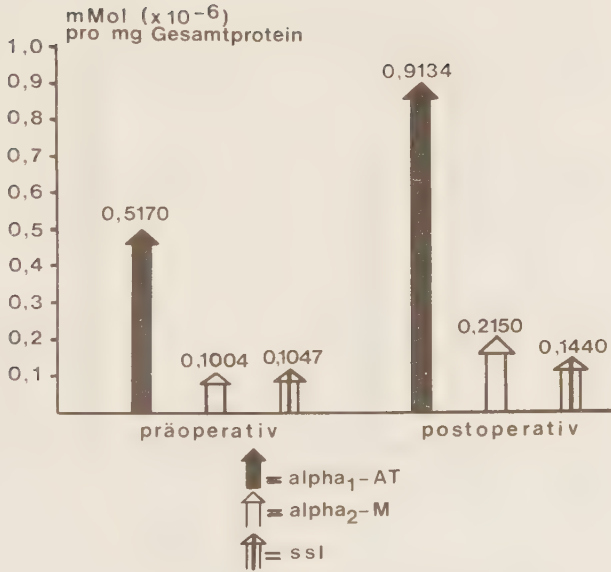


Abb. 17 : Vergleich der Durchschnittswerte der α_1 -AT-, α_2 -M- und ssI - Konzentrationen in präoperativen (linke Bildhälfte) und postoperativen (rechte Bildhälfte) Sekretproben von Cholesteatomeiterungen. (Die ssI - Konzentrationen wurden für diesen Vergleich von ImU in mMol umgerechnet).

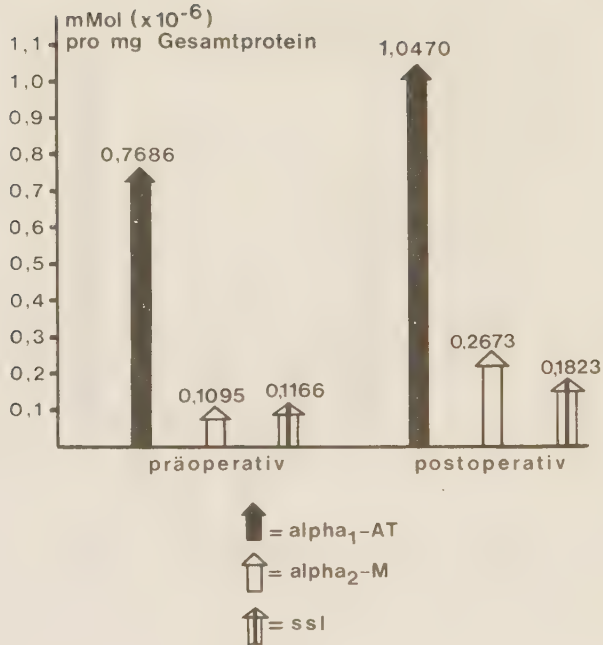


Abb. 18 : Vergleich der Durchschnittswerte der alpha₁-AT-, alpha₂-M- und ssI - Konzentrationen in präoperativen (linke Bildhälfte) und postoperativen (rechte Bildhälfte) Sekretproben von Schleimhauteiterungen. (Die ssI - Konzentrationen wurden für diesen Vergleich von ImU in mMol umgerechnet).

An diesen Gesamthemmkapazitäten sind die drei Inhibitoren wie folgt beteiligt (vgl. dazu auch Abbildungen 17 und 18; Gesamthemmkapazität = 100 %) :

bei allen präoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen α_1 -AT mit 71,6 %, α_2 -M mit 13,9 %, ssI mit 14,5 %;

bei allen präoperativen Proben von Schleimhauteiterungen α_1 -AT mit 77,3 %, α_2 -M mit 11,0 %, ssI mit 11,7 % ;

bei allen postoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen α_1 -AT mit 71,8 %, α_2 -M mit 16,9 %, ssI mit 11,3 %;

bei allen postoperativen Proben von Schleimhauteiterungen α_1 -AT mit 69,9 %, α_2 -M mit 17,9 %, ssI mit 12,2 %.

2. Vergleich der Konzentrationen von α_1 -AT, α_2 -M und ssI in den Sekreten von Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen

Vergleicht man zunächst den Durchschnitt der α_1 -AT - Konzentrationen mit den durchschnittlichen α_2 -M - Konzentrationen, so zeigt sich - sofern die Angabe in mMol erfolgt -, daß die Durchschnittswerte bei α_1 -AT durchwegs höher liegen als diejenigen bei α_2 -M, und zwar (vgl. Abbildungen 17, 18 und die oben angegebenen prozentualen Anteile an der Gesamthemmkapazität) :

bei allen präoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen 5,1 mal und von Schleimhauteiterungen 7,0 mal so hoch,

bei allen postoperativen Proben von Cholesteatomeite-
rungen 4,2 mal und von Schleimhauteiterungen
3,7 mal so hoch.

Die durchschnittlichen ssI - Konzentrationen entsprechen bei präoperativen Proben in etwa den Werten des α_2 -M und zeigen somit etwa den gleichen Konzentrationsunterschied zu α_1 -AT; bei postoperativen Proben liegen die ssI - Werte jedoch etwas niedriger als die α_2 -M - Werte (vgl. Abbildungen 17, 18), während die prozentualen Anteile des ssI an der Gesamthemmkapazität in prä- und postoperativen Proben nur sehr geringfügig differieren (s. oben).

Mit unseren Ergebnissen kann auch die Frage beantwortet werden, ob sich das Krankheitsbild der Cholesteatom-eiterung von demjenigen der Schleimhauteiterung in den Konzentrationen der drei Inhibitoren α_1 -AT, α_2 -M und ssI unterscheidet. In Ohrsekreten von Cholesteatomeiterungen wurde kürzlich eine höhere proteolytische Aktivität als in Sekreten von Schleimhauteiterungen festgestellt (14). Dies kann darauf zurückgeführt werden, daß bei Cholesteatomeiterungen zusätzlich die von ABRAMSON (1) festgestellten und besonders aktiven Kollagenasen aus der Cholesteatommatrix anfallen. Wir haben deshalb erwartet, der Gehalt an α_1 -AT und α_2 -M (beide Inhibitoren können Kollagenasen hemmen) werde in Sekretproben von Cholesteatomeiterungen höher sein als in denen von Schleimhauteiterungen, da ja die Komplexbildung mit Proteasen nicht den Nachweis dieser beiden Inhibitoren mit Partigen^(R) - Platten verhindert, sofern kein proteolytischer Abbau vorliegt. Unsere Ergebnisse zeigen aber,

daß Sekretproben von Cholesteatomeiterungen etwa den gleichen Gehalt an α_1 -AT und α_2 -M wie die Proben von Schleimhauteiterungen haben; bei präoperativen Proben von Cholesteatomeiterungen liegt der α_1 -AT-Gehalt sogar niedriger als bei präoperativen Proben von Schleimhauteiterungen (vgl. dazu Abbildungen 7 und 12). Allerdings steht ja noch nicht fest, daß α_1 -AT und α_2 -M auch gerade diese Kollagenase aus der Cholesteatommatrix hemmen. Unsere Ergebnisse scheinen gegen eine solche Hemmfähigkeit zu sprechen.

Die Konzentrationen des ssI liegen durchschnittlich in den präoperativen Proben von Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen gleich, in postoperativen Sekretproben von Cholesteatomeiterungen jedoch geringfügig niedriger als in postoperativen Proben von Schleimhauteiterungen (vgl. dazu Abbildung 15).

Nach unseren Ergebnissen unterscheiden sich also die beiden Krankheitsbilder Cholesteatom- und Schleimhauteiterung in ihrem inhibitorischen System nicht wesentlich, soweit es sich um die drei Proteaseninhibitoren α_1 -AT, α_2 -M und den ssI handelt.

IX. Zusammenstellung sämtlicher untersuchten Sekretproben mit Gesamtproteinmengen,
Inhibitorkonzentrationen und Bakteriologie

1. Sekretproben von Cholesteatomeiterungen :

Proben-Nr.	Gesamt-protein (mg/ml)	alpha ₁ -AT (mMol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge-samtprotein)	alpha ₂ -M (mMol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge-samtprotein)	SSI (ImU pro mg Gesamtpro-tein)	Bakteriologie
1	2,6858	0,4660	0,1937	0,3931	---
2	1,8734	0,4291	0,1191	1,0123	Escherichia coli, Pseudomonas pyoc.
3	1,3677	0,7662	0,3601	--	Staphylococcus aureus hämolyticus
4	1,1489	0,3694	0,1277	0,9789	Sproßpilze der Candidagruppe
5	1,1078	--	--	0,6411	Staphyl., Sproßpilze der Candida-gruppe, Aspergillus fumigatus
6 / 7	0,5260 0,7120	1,7620 1,7143	-- --	1,4401 2,9780	Proteus providentia, Pseudomonas pyoc. "
8 / 9	0,3760 2,4365	-- 0,5717	-- 0,2760	3,8279 1,1068	Proteus providentia, Pseudomonas pyoc. "
10 / 11	1,9946 0,8591	0,6100 1,5034	-- 0,5524	1,6331 --	Proteus providentia, Pseudomonas pyoc. "
12 / 13	0,6169 0,5371	-- 2,2374	-- --	1,7682 2,2564	Staphyl.albus, Keime d. Proteusgruppe "

Proben-Nr.		Gesamtprotein (mg/ml)	alpha ₁ -AT (mmol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge-samtprotein)	alpha ₂ -M (mmol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge-samtprotein)	ssI (ImU pro mg Gesamtprotein)	Bakteriologie
14 / 15	u. postop. (untere Zeile) Proben von jeweils demselben Patient	4,7334 3,6331	0,3446 0,5255	0,0981 0,1716	0,3536 0,7089	--- ---
16 / 17		2,0077 0,8131	0,7817 1,7390	0,1504 0,3456	0,3924 0,8198	Staphylococcus albus, Pseudomonas pyoc. "
18 / 19		1,7200 2,4387	0,8718 0,6184	-- 0,1314	0,7399 0,3976	Keime der Proteusgruppe "
20 / 21		3,7857 0,3690	0,4129 --	0,1060 --	0,5401 6,5697	Pseudomonas pyocyanea "
22 / 23		3,8244 2,0265	0,3934 0,7891	0,1083 0,2747	0,5149 1,0165	hämol. Streptokokken, Pseudomonas pyoc. "
24 / 25		1,9760 2,1453	0,5503 0,8896	0,2425 0,5260	1,4731 1,8253	Proteus providentia, Pseudomonas pyoc. "
26	postop. Einzelproben	3,0979	0,5615	0,2686	0,5671	Staphylococcus aureus hämolyticus
27		2,1780	0,5929	0,2526	0,6260	---
28		3,1007	0,4632	0,1586	0,9771	negativ
29		2,3792	0,5872	0,2479	0,3184	Escherichia coli, Pseudomonas pyoc.

Zusammenstellung sämtlicher untersuchter Sekretproben mit Gesamtproteinmengen,
Inhibitorkonzentrationen und Bakteriologie (Fortsetzung)

2. Sekretproben von Schleimhautreiterungen :

Proben-Nr.	Gesamt-protein (mg/ml)	alpha ₁ -AT (mMol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge- samtprotein)	alpha ₂ -M (mMol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge- samtprotein)	SSI mg Gesamt- protein)	Bakteriologie
30	1,0985	--	--	--	Pseudomonas pyocyanea
31	2,7095	0,4850	0,1569	0,6709	Pseudomonas pyocyanea
32	1,6774	0,7467	--	1,7613	hämolysierende Staphylokokken
33	4,1956	0,3655	0,1781	0,3791	---
34	2,9108	0,4303	0,2355	0,2290	Pseudomonas pyocyanea
35	5,6188	0,3046	0,1274	1,6078	Escherichia coli, Proteus provid.
36 / 37	0,9015 0,6481	1,4775 1,7137	0,4197 0,4347	2,1848 2,8514	saprophytäre Mischflora "
38 / 39	3,4892 3,1314	0,3879 0,4527	0,1268 0,2018	0,2779 0,7596	Staph. aureus hämol., Pseudomonas pyoc. "
40 / 41	0,6786 0,7794	1,7546 1,5681	-- 0,4901	3,1480 3,2462	Staph. aureus hämol., Escherichia coli "

präop. (obere Zeile) u. post-
op. (untere Zeile) Proben v.
jeweils demselben Patienten

Proben-Nr.	Gesamt-protein (mg/ml)	alpha ₁ -AT (mmol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge- samtprotein)	alpha ₂ -M (mmol x 10 ⁻⁶ pro mg Ge- samtprotein)	SSI (Imu pro mg Gesamt- protein)	Bakteriologie
42 / 43	1,0920 0,5146	1,4287 2,4266	-- --	1,6650 2,6496	Proteus provid., Sproßpilze d. Candida " gruppe
44 / 45	0,7484 2,6568	1,4094 0,4884	-- 0,1501	3,7451 0,6842	--- ---
46 / 47	3,4115 2,6140	0,4824 0,4879	0,1224 0,1484	0,7460 0,8694	Proteus providentialia "
48 / 49	0,6760 2,8784	1,3603 0,5530	-- 0,2271	0,4343 1,2880	Staph. aureus hämol., Pseudomonas pyoc "
50 / 51	1,4823 2,1782	0,3982 0,7915	0,1321 0,2685	0,3176 1,1460	Proteus provid., Sproßpilze d. Candida " gruppe
52 / 53	1,8530 1,3785	0,4991 0,6410	0,1444 0,2904	0,3283 0,9758	--- ---
54	0,8490	1,3836	0,4895	0,8716	Staphyloc. albus, Pseudomonas pyoc.
55	0,5056	--	--	4,8753	Staph. aureus hämol., Sproßpilze d. Candida gruppe
56	1,1469	1,1680	0,4320	2,5364	Staphyloc. hämol., Pseudomonas pyoc.
57	1,4970	0,9432	0,2107	1,7894	---
58	2,1057	1,1932	0,3992	0,9875	---
postop. Einzelproben					

D. DISKUSSION

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen Sekrete von Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen erheblich besser mit Proteaseninhibitoren ausgestattet zu sein als bisher angenommen wurde.

Offenbar kommt unter den drei Inhibitoren, nach deren Vorkommen die Sekrete untersucht wurden, dem α_1 -AT die größte Bedeutung in der Hemmung von Proteasen bei chronischen Mittelohreiterungen zu. Auch bei diesem Krankheitsbild scheint α_1 -AT als "acute phase protein" zu wirken, da es wegen seines vergleichsweise geringen Molekulargewichts sehr leicht laufend vom intravaskulären in den extravaskulären Raum übertreten kann und die Serumkonzentration hoch ist (vgl. theoretischer Teil). Überraschenderweise erreicht aber α_2 -M (vgl. Abbildungen 17, 18) immerhin durchschnittlich ein Fünftel (in präoperativen Sekreten) bzw. sogar ein Viertel (in postoperativen Sekreten) der Sekretkonzentration von α_1 -AT (bei Angabe in mMol pro mg Gesamtprotein).

Berücksichtigt man, daß einerseits das Molekulargewicht des α_2 -M weit über 10-mal größer als das des α_1 -AT ist und daß andererseits im Serum die Konzentration des α_2 -M etwa 0,35 mMol / 100 ml, die des α_1 -AT jedoch etwa 5,1 mMol / 100 ml beträgt, dann ergibt sich daraus, daß in der präoperativen Phase sich die Gefäßpermeabilität für α_2 -M aufgrund der entzündlichen Vorgänge erheblich vergrößert im Vergleich zu Normalbedingungen, in denen 80 - 90 % des α_2 -M im intravaskulären Raum verbleiben (58). Ein solcher Anstieg der Gefäßpermeabilität für α_2 -M ist bereits bei anderen Krankheitsbildern und in anderen Körperbereichen beobachtet worden (3).

Dagegen ist der Konzentrationsanstieg des α_2 -M in den postoperativen Sekreten, in denen sich das Verhältnis zwischen α_1 -AT und α_2 -M zugunsten des α_2 -M verschiebt (vgl. Abbildungen 17, 18), vor allem auf die Eröffnung von Blutgefäßen während der Operation und das damit verbundene Einschwellen dieses Inhibitors zurückzuführen, ein sicherlich zum Heilungsprozeß beitragender Vorgang.

Nach der Entdeckung eines säurestabilen Inhibitors in Nasen- und Bronchialsekreten konnte das Vorkommen eines säurestabilen Inhibitors auch in entzündlichen Ohrsekreten erwartet werden. Sein Nachweis gelang in 93 % aller untersuchten Sekretproben. An seiner Identität mit dem Nasen- und Bronchialsekretinhibitor ist aufgrund des gleichen Molekulargewichts (ca. 13 000) kaum zu zweifeln.

Zu dem Zeitpunkt, als sich erste Anzeichen für die Existenz des ssI in den Ohrsekreten von Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen ergaben, lag es noch nahe, den ssI als spezifisches Produkt der Paukenschleimhaut anzusehen. Bei einer chronischen Mittelohreiterung kommt es nämlich zu einer Zunahme der sezernierenden Becherzellen und zu einer Abnahme der Flimmerepithelzellen (51); auch in der postoperativen Phase ist die Anzahl der Becherzellen zunächst noch vergrößert, da sich die Normalisierung des Epithels über mehrere Wochen hinzieht. Wir dachten auch daran, daß der ssI möglicherweise auf die Transsudation von bisher unbekannten säurestabilen Serum-inhibitoren zurückzuführen sei, wenngleich gerade die säurestabile antiproteolytische Aktivität des Serums bereits Gegenstand eingehender Untersuchungen war.

Die genannten Annahmen sind aber als überholt anzusehen, nachdem inzwischen der ITI als Vorstufe ("precursor") nicht nur des säurestabilen Serum- und Harninhibitors, sondern sehr wahrscheinlich auch des säurestabilen Nasen- und Bronchialsekretinhibitors erkannt wurde (12, 16). Bei diesen Untersuchungen hatte sich gezeigt, daß nur etwa die Hälfte der Hemmkapazität des ITI in den säurestabilen Serum- und Harninhibitor übergeführt wird und ein Derivat des ITI verbleibt. Es bestehen viele Anhaltspunkte dafür, daß aus diesem Derivat des ITI, das wohl leicht in den extravaskulären Raum übertreten kann, die miteinander vermutlich identischen säurestabilen Inhibitoren des Ohrsekrets und des Respirationstrakts hervorgehen. Die Freisetzung dürfte durch Einwirkung eines speziellen Enzyms (eventuell Kallikrein) erfolgen.

Im Hinblick darauf, daß in Bronchialsekreten der Anteil des darin vorhandenen säurestabilen Inhibitors an der Gesamthemmkapazität bis zu 70 % beträgt und damit wesentlich höher liegt als der Anteil des α_1 -AT (15), erscheinen die Konzentrationen des ssI in den von uns untersuchten Ohrsekreten verhältnismäßig gering : Seine Durchschnittskonzentration betrug selbst in postoperativen Proben von Schleimhauteiterungen, in denen der höchste Durchschnittswert gefunden wurde, nur 1,82 ImU pro mg Gesamtprotein; sein Anteil an der Gesamthemmkapazität stieg nicht über 14,5 %. Diese geringen Werte sind darauf zurückzuführen, daß im Gegensatz zum Bronchialsekret, das auch bei im Respirationsbereich gesunden Personen entnommen werden kann, die Ohrsekrete nur von ohrkranken Patienten gewonnen werden können, da bei ohrgesunden Personen keine Sekretion vorliegt; auch in der postoperativen Phase sind noch keine normalen Verhältnisse vorhanden.

Wir nehmen an, daß nicht nur der ssI aufgrund der pathologischen proteolytischen Aktivität in den Ohrsekreten von Proteasen abgebunden wird (dies allein würde in vitro noch nicht zu einem niedrigen Inhibitorspiegel führen, da durch die Enteiweißung auch der abgegebene ssI freigesetzt und nachgewiesen wird), sondern daß entweder der ssI selbst oder der ITI als seine Vorstufe oder das freisetzende Enzym proteolytisch abgebaut werden. Dies gilt auch für die postoperative Phase, in der, wie wir erläutert haben, immer noch proteolytische Aktivität vorhanden sein dürfte, allerdings in geringerem Maße als in der präoperativen Phase. Auf diese Verminderung der Proteasentätigkeit und darauf, daß während der Operation durch Eröffnung von Blutgefäßen der ITI vermehrt in den Mittelohrraum eingeschwemmt wird, führen wir andererseits die postoperative Erhöhung der ssI - Konzentrationen zurück, die aber wegen der noch vorhandenen Proteasentätigkeit nicht die Werte des säurestabilen Nasen- und Bronchialsekretinhibitors erreichen können.

Aufgrund der angenommenen Identität des säurestabilen Nasen- und Bronchialsekretinhibitors und des ssI dürfte auch das Hemmspektrum dieser Inhibitoren identisch sein. Deshalb kann angenommen werden, daß der ssI neben Trypsin und Chymotrypsin auch leukozytäre Proteasen zu hemmen vermag. Gerade die Hemmung von leukozytären Proteasen ist von großer Bedeutung, da durch die bei der Mittelohreiterung vorhandene Einwanderung von Leukozyten und deren Zerfall eine zu der Tätigkeit von bakteriellen Proteasen und Gewebsproteasen hinzukommende proteolytische Aktivität frei wird. Ob der ssI auch speziell die mikrosomale Elastase aus menschlichen Granulozyten hemmen kann, die 1972 nachgewiesen wurde (26) und die bei der Ossikuladestruktion neben einer Gewebskollagenase aus der Cholesteatommatrix beteiligt sein dürfte, muß noch dahingestellt bleiben.

Nach den vorliegenden Untersuchungen scheinen in den Sekreten von Cholesteatom- und Schleimhauteiterungen in vivo alle verfügbaren Mengen der drei Inhibitoren α_1 -AT, α_2 -M und ssI zur Unschädlichmachung von Proteasen benötigt zu werden; in der präoperativen Phase besteht ein Übergewicht der Proteasen gegenüber dem inhibitorischen System.

Unsere Ergebnisse lassen keine Aussage über einen direkten Zusammenhang zwischen den Hemmstoffkonzentrationen und der Art der an der pathogenen Keimflora beteiligten Bakterien zu. Das liegt zum Teil daran, daß es sich bei den Mittelohreiterungen meistens um den gleichzeitigen Befall mit mehreren, teilweise sehr verschiedenartigen Bakterienstämmen handelt (s. Gesamttabelle S. 62 ff). Die wenigen Fälle, in denen eine alleinige Besiedelung mit *Pseudomonas aeruginosa* (pyocyanea) festgestellt worden war, wiesen einen α_1 -AT - Gehalt auf, obwohl - wie schon erwähnt - ein Abbau des α_1 -AT durch die Proteasen dieses Bakteriums angenommen wird (38). Allerdings lag in den genannten Fällen der α_1 -AT - Gehalt durchwegs niedriger als in den Sekretproben, deren Bakteriologie keinen alleinigen Befall mit *Pseudomonas aeruginosa* aufwies.

E. EXPERIMENTELLER TEIL

I. Vorbereitung der Sekretproben

Das Sekret wurde aus dem Mittelohr durch direkten Abstrich mit einem Wattetupfer über den äußeren Gehörgang entnommen. Wenn eine sofortige weitere Aufbereitung nicht möglich war, wurden die Tupfer sogleich tiefgefroren.

Die Wattetupfer schwemmten wir mit je 3 ml physiologischer Kochsalzlösung auf, preßten sie mit Kunststoffstäben aus und zentrifugierten die Lösungen mit den Tupfern ca. 10 min. bei 5 000 Upm. Den Überstand filterten wir zusätzlich. Die so erhaltenen Sekretlösungen bildeten die Grundlage für alle Versuche.

II. Die Ninhydrin - Reaktion zur Ermittlung der Gesamtproteinmenge pro Sekretlösung

1. Prinzip

Die Proteine in den Sekretlösungen und in einer Test- (Referenz-)lösung mit bekannter Proteinkonzentration werden zu Aminosäuren hydrolysiert. Ninhydrin oxydiert die Aminosäuren zu einem um ein C-Atom ärmeren stickstofffreien Aldehyd. Dabei werden NH_3 und CO_2 frei; das Ninhydrin selbst wird reduziert. Aus Ninhydrin, reduziertem Ninhydrin und NH_3 bildet sich ein blauer Farbstoff, dessen Extinktion photometrisch bestimmt wird. Mit Hilfe der Extinktion, die sich bei der Restlösung mit bekannter Proteinkonzentration ergibt, kann die Proteinkonzentration in den Sekretlösungen berechnet werden. Die Reaktion ist sehr empfindlich : man kann damit noch weniger als 1 μg einer Aminosäure nachweisen.

2. Material

Test-(Referenz-)lösung : 100 mg Albumin in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung;

2,5 N NaOH;

30 %ige Essigsäure;

Ninhydrinlösung : 40 gr Ninhydrin auf 1,5 l Äthylen-Glycoll-Monomethyläther (Methylcellosolve), dazu 500 ml 4 N Na-Acetat-Puffer und 800 mg SnCl_2 ;

Propanol, 1 : 1 mit aqua dest. verdünnt.

3. Methode

Je nach geschätzter Menge der in den Sekretlösungen enthaltenen Proteine wurden die Lösungen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Wir pipettierten in 2 Reagenzgläser je 50 μl und in weitere zwei Gläser je 100 μl der Test-(Referenz-)lösung. Von jeder Sekretlösung wurden die gleichen Mengen in jeweils vier Gläser pipettiert (pro Versuchsgang wurden sechs Sekretproben untersucht = 24 Gläser + 4 Gläser Testlösung).

In alle Gläser füllten wir je 0,5 ml 2,5 N NaOH und stellten sie dann zur Hydrolyse 45 Minuten in ein kochendes Wasserbad.

Anschließend wurden die Lösungen mit je 0,5 ml 30 %iger Essigsäure neutralisiert, mit je 1 ml Ninhydrinlösung versetzt und 15 Minuten in ein kochendes Wasserbad gestellt.

Anschließend pipettierten wir in alle Gläser je 5 ml Propanol und bestimmten dann die Extinktion bei 578 nm. Dabei stellten wir zunächst mit einer Küvette (Schichtdicke 1 cm), die nur mit Propanol gefüllt war, das rechte

Skalenende auf 0 ein. Zur Extinktionsbestimmung der Lösungen wurde dieselbe Küvette verwendet; wir spülten sie jeweils mit einem Teil der Lösungen vor. Von den pro Sekret- und Testlösung erhaltenen vier Werten bildeten wir Durchschnittswerte und ermittelten mit Hilfe der bekannten Proteinkonzentration der Testlösung den Gesamtproteingehalt einer jeden Sekretlösung.

III. Mancini-Test mit M - Partigen^(R) - Immundiffusionsplatten

1. Prinzip

Die Platten dienen zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen und enthalten in einer gebrauchsfertigen Agargelschicht monospezifisches Antiserum gegen das zu bestimmende Plasmaprotein.

In diese Agargelschicht sind zylinderförmige Auftragsstellen eingestanz, die mit den zu untersuchenden Serum- bzw. Plasmaproben gefüllt werden. Die darin enthaltenen gelösten Antigenmoleküle diffundieren radial in die das homologe Antiserum enthaltende Agargelschicht, wobei sich aufgrund der Antigen-Antikörper-Reaktion Präzipitationsringe bilden. Deren nach einer bestimmten Zeit abzulesender Durchmesser ist direkt proportional der Menge des Antigens (= des zu bestimmenden Proteins) bei vorgegebener Antiserumkonzentration im Reaktionsgel (4).

2. Material

M - Partigen^(R) - Immundiffusionsplatten der Behringwerke (M-Partigen-alpha₁-Antitrypsin und M-Partigen-alpha₂-Makroglobulin);

Protein-Standard-Plasma (für die Bestimmung von α_1 -AT), lyophilisiert, mit einer α_1 -AT-Konzentration von 172 mg/100 ml, Behringwerke;

Protein-Standard-Serum B (für die Bestimmung von α_2 -M), mit drei Lösungen von verschiedener α_2 -M-Konzentration, Behring-Werke.

Erste Packung Protein-Standard-Serum B :

Lösung I : 60 mg α_2 -M / 100 ml

Lösung II : 120 mg α_2 -M / 100 ml

Lösung III : 233 mg α_2 -M / 100 ml

Zweite Packung Protein-Standard-Serum B :

Lösung I : 57 mg α_2 -M / 100 ml

Lösung II : 117,5 mg α_2 -M / 100 ml

Lösung III : 234 mg α_2 -M / 100 ml

Hamilton - Mikroliter - Spritze zum Auftragen der Lösungen;

Meßschablone zum Ausmessen der Durchmesser der Präzipitationsringe auf 0,1 mm genau (mit Lupe).

3. Methode

Zur Bestimmung von α_1 -AT wurde zunächst das lyophilisierte Protein-Standard-Plasma mit dem α_1 -AT-Gehalt von 172 mg / 100 ml in 0,5 ml aqua dest. aufgelöst.

Anschließend stellten wir mit physiologischer Kochsalzlösung die vorgeschriebenen Verdünnungen des Protein-Standard-Plasmas von 1 : 12, 1 : 6 und 1 : 3 her.

Mit je 5 μ l dieser Verdünnungen beschickten wir die ersten drei Auftragsstellen jeder α_1 -AT - Platte, die demnach folgende Konzentrationen an α_1 -AT enthielten :

Auftragsstelle 1: Verdünnung 1:12 = 14,33 mg/100 ml =
= 0,716 µg/5 µl;
Auftragsstelle 2: Verdünnung 1:6 = 28,66 mg/100 ml =
= 1,433 µg/5 µl;
Auftragsstelle 3: Verdünnung 1:3 = 57,33 mg/100 ml =
= 2,866 µg/5 µl.

Zur Bestimmung von α_2 -M beschickten wir die ersten drei Auftragsstellen jeder α_2 -M - Platte mit je 5 µl der gebrauchsfertigen Lösungen I, II und III des Protein-Standard-Serum B. Die ersten drei Auftragsstellen jeder dieser Platten enthielten demnach folgende α_2 -M - Konzentrationen :

Bei Verwendung der ersten Packung :

Auftragsstelle 1: Lösung I = 60 mg/100 ml =
= 3 µg/5 µl;
Auftragsstelle 2: Lösung II = 120 mg/100 ml =
= 6 µg/5 µl;
Auftragsstelle 3: Lösung III = 233 mg/100 ml =
11,65 µg/5 µl.

Bei Verwendung der zweiten Packung :

Auftragsstelle 1: Lösung I = 57 mg/100 ml =
= 2,85 µg/5 µl;
Auftragsstelle 2: Lösung II = 117,5 mg/100 ml =
= 5,875 µg/5 µl;
Auftragsstelle 3: Lösung III = 234 mg/100 ml =
= 11,7 µg/5 µl.

Von den restlichen neun Auftragsstellen jeder α_1 -AT- oder α_2 -M - Platte wurden je drei für jede Sekretlösung verwendet und mit 6 µl, 8 µl und 10 µl der jeweiligen Lösung beschickt (s. oben Teil C IV 1).

Die beschickten Platten blieben bei Zimmertemperatur fest verschlossen. Frühestens nach zwei Tagen (bei α_1 -AT) bzw. nach drei Tagen (bei α_2 -M) ermittelten wir die Durchmesser der gebildeten Präzipitationsringe mit der Meßschablone auf 0,1 mm genau (schwarzer Untergrund, seitliche Beleuchtung, Lupe) und quadrierten sie. Die Berechnung der α_1 -AT - bzw. α_2 -M-Konzentrationen erfolgte in der schon oben (Teil C IV 1) beschriebenen Weise mit Hilfe der ersten drei Präzipitationsringe jeder Platte, denen jeweils bekannte Proteinkonzentrationen zugrunde lagen.

IV. Enteiweißung der Sekretlösungen

Je 1 ml Ohrsekretlösung wurde mit 0,1 ml 70 %iger Perchlorsäure versetzt und anschließend 10 Minuten mit 4 500 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 N NaOH auf einen bei etwa 7 liegenden pH-Wert neutralisiert.

V. Trypsin-Hemmtest zur Ermittlung der ssI - Konzentration und der Gesamthemmung

1. Prinzip

Der Inhibitorgehalt einer Lösung kann dadurch festgestellt werden, daß man ein geeignetes Substrat dem "Angriff" einer definierten Menge von Proteasen aussetzt, die vom Inhibitor gehemmt werden können. Verwendet man nämlich als Substrat N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid (= L - BAPA) und als Protease Trypsin, dann entstehen durch Trypsineinwirkung die Substratbruchstücke N-Benzoyl-L-arginin und p-Nitroanilid-hydrochlorid, die photometrisch durch Extink-

tionsänderung nachgewiesen werden können. Zwischen der Zeiteinheit der Messung und der Quantität der entstandenen Spaltprodukte besteht eine Beziehung.

Bei der Zugabe der zu untersuchenden Lösung kann eine Abnahme der Extinktionsänderung pro Zeiteinheit festgestellt werden, wenn die Lösung einen Inhibitor enthält. Die Verminderung der Extinktionsdifferenz gegenüber dem Leerwert (= Ansatz ohne Sekretlösung) entspricht dem Inhibitorgehalt der Lösung.

2. Material

Trypsinlösung, hergestellt aus Trypsin vom Rind, TPCK-behandelt, etwa 5 mg gelöst in 0,0025 N Salzsäure.

N-Benzoyl-L-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid
(L - BAPA, Substrat des Trypsins), 1 g gelöst in 1 ltr. Wasser.

0,2 M Triäthanolamin-HCl - Puffer (= TRA-Puffer),
pH 7,8.

3. Methode

Pro untersuchter Sekretlösung wurden zur Ermittlung des ssI die Küvetten (Schichtdicke 1 cm) folgendermaßen beschriftet :

	Küvette 1	Küvette 2	Küvette 3	Küvette 4
Trypsin- Lösung	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml	0,2 ml
TRA-Puffer	1,8 ml	1,7 ml	1,6 ml	1,3 ml
enteiweißte Sekretlösung (mischen, 5 min. vorinkubieren)	-	0,1 ml	0,2 ml	0,5 ml
L - BAPA (mischen)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

Der Start erfolgte nach der Zugabe des L - BAPA. Fünf Minuten lang wurde jede Minute die Extinktion abgelesen. (Testvolumen 3 ml, Meßstrahlung 405 nm, Messung gegen Luft bei 25° C mit thermokonstanten Küvettenhalten).

Zur Ermittlung der Gesamthemmung vor Enteiweißung pipettierten wir

	Küvette	Küvette
	1	2
Trypsin-Lösung	0,2 ml	0,2 ml
TRA-Puffer	1,8 ml	1,3 ml
nicht- enteiweißte		
Sekretlösung (mischen, 5 min. vorinkubieren)	-	0,5 ml
L - BAPA (mischen)	1 ml	1 ml

Im übrigen wurde wie oben verfahren.

Berechnung :

Eine Inhibitormillieinheit (ImU) ist diejenige Inhibitormenge, die 1 mU (Millieinheit) Trypsin zu hemmen vermag. Eine mU Trypsin ist diejenige Menge Trypsin, die 1 μ mol L - BAPA pro Minute bei 25° C hydrolysiert. Spektrophotometrisch entspricht 1 mU Trypsin einer Extinktionsänderung von 0,00664 pro Minute im 3-ml-Ansatz. Entsprechend hemmt eine Inhibitormillieinheit (ImU) für Trypsin den Extinktionswert pro Minute um denselben Betrag. Der Inhibitorgehalt der eingesetzten Versuchslösung ist :

$$\frac{(\text{E/min.})_{\text{Trypsin}} - (\text{E/min.})_{\text{Versuchslösung}}}{0,00664}$$

in ImU (45). Zumeist legten wir der Berechnung die Extinktionswerte zugrunde, die sich beim Ansatz von 0,5 ml Sekretlösung ergeben hatten.

VI. Bestimmung des Molekulargewichts des ssI durch Gelfiltration mit Sephadex^(R) - G 75

1. Prinzip

Sephadex^(R) - G 75 ist ein modifiziertes Dextran mit dreidimensionalem Raumnetz. In Pufferlösung gequollen und in eine Chromatographiesäule gefüllt, stellt das Dextrangel ein "Sieb" für auf die Säule aufgetragene Moleküle dar : kleinere Moleküle verfangen sich in den Zwischenräumen des Netzwerks und dringen in die Poren der Gelteilchen ein, größere Moleküle dagegen umgehen die Gelteilchen, wenn der Durchmesser dieser Moleküle größer ist als der Porendurchmesser der Gelteilchen. Größere Moleküle durchwandern die Chromatographiesäule deshalb schneller als kleinere Moleküle. Mit Hilfe einer vorher vorgenommenen Gelfiltration mit Substanzen, deren Molekulargewicht bekannt ist, läßt sich durch dieses Verfahren das Molekulargewicht von aufgetragenen Molekülen berechnen.

2. Material

Sephadex^(R) - G 75;

Chromatographiesäule 2 cm x 150 cm;

Fraktionierapparat mit Kurvenschreiber;

Puffer : 0,05 molar Di-Natrium-teraborat-10 Hydrat,
0,2 molar NaCl; pH 8,0;

Bronchial- und Ohrsekretlösungen.

3. Methode

Sephadex^(R)- G 75 wurde mit dem Boratpuffer zu einer gießbaren Suspension verdünnt und in die Chromatographiesäule gefüllt, die anschließend mit Puffer vorgespült wurde.

Das als Testsubstanz vorgesehene Bronchialsekret wurde mit Perchlorsäure enteiweißt, mit 5 N NaOH neutralisiert, an der Destille eingedampft und der Druckdialyse zur partiellen Entsalzung unterzogen (Amicon-Dialyse-Kammern mit UM-2-Membranen). Das anschließend auf die Säule aufgetragene Volumen des Bronchialsekrets betrug ca. 15 ml. In den nach dem Durchlauf erhaltenen Fraktionen zu je 80 Tropfen lokalisierten wir den säurestabilen Bronchialsekretinhibitor mit dem Molekulargewicht von ca. 13 000 durch den Trypsin-Hemmtest nach bekannter Methode (vgl. oben).

Für die Gelfiltration des Ohrsekrets wurden ca. 100 Sekretabstriche von Patienten mit Cholesteatom- oder Schleimhauteiterung mit 100 ml Perchlorsäure enteiweißt und zentrifugiert (ca. 5 000 UpM, 10 min.). Die Überstände wurden filtriert, mit 5 N NaOH neutralisiert und durch Druckdialyse partiell entsalzt (Amicon-Dialyse-Kammern mit UM-2-Membranen). Das Auftragsvolumen betrug ebenfalls ca. 15 ml. In den erhaltenen Fraktionen (je 80 Tropfen) bestimmten wir durch den Trypsin-Hemmtest die antiproteolytische Aktivität des ssI, die - wie oben im Teil C unter VIII. näher erläutert - in demselben Fraktionsbereich lokalisiert war, in dem auch der säurestabile Bronchialsekretinhibitor ausgetreten war.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Den Gegenstand der vorliegenden Untersuchung bildeten Ohrsekretproben von Patienten, die an einer chronischen Mittelohrentzündung in der Form der Cholesteatomeiterung oder der Schleimhauteiterung erkrankt waren. Wir bestimmten den Gehalt der Proteaseninhibitoren α_1 -Antitrypsin (α_1 -AT) und α_2 -Makroglobulin (α_2 -M) in diesen Sekretproben und prüften, ob in ihnen auch ein säurestabiler Proteaseinhibitor (ssI) enthalten ist.

Alle drei genannten Proteaseninhibitoren konnten in den entzündlichen Ohrsekreten nachgewiesen werden. Die Konzentrationen des α_2 -M, die etwa ein Viertel bis ein Fünftel der α_1 -AT - Konzentrationen betragen, liegen höher als erwartet. Die Konzentrationen des ssI erreichen nicht die Werte des säurestabilen Inhibitors in Nasen- und Bronchialsekreten, da die Ohrsekrete nur von ohrkranken Personen gewonnen werden konnten.

Die postoperativen Sekretproben sowohl von Cholesteatomeiterungen als auch von Schleimhauteiterungen weisen einen höheren Gehalt der drei Inhibitoren als die präoperativen Proben auf.

Der ssI in den Ohrsekreten besitzt dasselbe Molekulargewicht wie der säurestabile Nasen- und Bronchialsekretinhibitor, nämlich ca. 13 000. An der Identität dieser Inhibitoren ist kaum zu zweifeln. Beide Inhibitoren werden vermutlich aus dem Inter-alpha-Trypsin-inhibitor durch Einwirkung eines Enzyms freigesetzt.

Insbesondere in der präoperativen Phase scheinen der α_1 -AT und α_2 -M, durch Bindung an Proteasen "maskiert" zu sein, so daß die Proteasen das Übergewicht über das inhibitorische System erlangen können.

Das Krankheitsbild der Cholesteatomeiterung unterscheidet sich in den Konzentrationswerten der drei Inhibitoren nur unwesentlich von der Schleimhauteiterung.

Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Proteaseninhibitorkonzentrationen und der Art der Bakterien, die in den Sekreten nachgewiesen worden waren, ließ sich nicht feststellen.

G. LITERATURVERZEICHNIS

1) ABRAMSON, M. :

Collagenolytic Activity in Middle Ear Cholesteatoma.
Annals of Ot., Rhin.a.Lary 78 (1969), S. 112

2) ASTRUP, T., NISSEN, U. :

Urinary Trypsin Inhibitor (Mingin) : Transformation
into a New Trypsin Inhibitor by Acid Hydrolysis
or by Sialidase.
Nature (London) 203 (1964), S. 255

3) BARRETT, A.J., STARKEY, P.M. :

The Unique Nature of the Interaction of α_2 -
Macroglobulin with Proteinases.
In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd
International Research Conference (Bayer-Symposium V).
Ed. : H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and
E. TRUSCHEIT
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 14

4) BECKER, W., RAPP, W., SCHWIEK, H.G., STÖRIKO, K. :

Methode zur quantitativen Bestimmung von Plasma-
proteinen durch Immunpraecipitation.
Z. für klin.Chem.u.klin.Biochem. 6 (1968), S. 113

5) ENGELHARDT, A., LOMMEL, H. (Hrsgb.) :

Serumproteine.
Verlag Chemie Weinheim 1974, S. 10

6) ERLANGER, B.F. :

A Possible Role for Arginine in Enzyme Mechanisms.
Proc.Nat.Acad.Sci. US 46 (1960), S. 1430

7) FAGERHOLD, M.K. :

Acid Starch Gel Electrophoresis for Detection of Alpha-Antitrypsin Variants (Pi Types) : Outline of Techniques Employed Currently.

In : Pulmonary Emphysema and Proteolysis.

Ed.: C. MITTMANN, Academic Press New York - London 1972, S. 145

8) FEUTH, H., KEMKES, B.M., HOCHSTRASSER, K. :

Frühzeitige Erkennung einer Abstoßungskrise nach Nierentransplantation durch Bestimmung eines niedermolekularen Proteasen-Inhibitors im Serum und Harn .
Langenbecks Arch.Chir.Suppl.Chir.Forum 1975, S. 133

9) FRITZ, H., HEIMBURGER, N., MEIER, M., ARNOLD, M., ZANEVELD, L.J.D., SCHUMACHER, G.F.B. :

Humanacrosin : Zur Kinetik der Hemmung durch Human-Seruminhibitoren.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem.353 (1972), S. 1953

10) FRITZ, H., TRAUSCHOLD, J., WERLE, E. :

Protease - Inhibitoren.

In : Methoden der enzymatischen Analyse, Band I, 2. Auflage.

Hrsgb. : H.U. BERGMAYER, Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße 1970, S. 1021

11) HEIMBURGER, N. :

Biochemistry of Proteinase Inhibitors from Human Plasma : A Review of Recent Development.

In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd International Research Conference (Bayer-Symposium V).

Ed. : H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and E. TRUSCHEIT, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 14

12) HILLA, W. :

Untersuchung des Inter-alpha-Trypsin-Inhibitors
als Vorstufe der säurestabilen Proteaseninhibitoren
im menschlichen Serum und Harn.

Inauguraldissertation München 1976, S. 42

13) HOCHGESAND, K., HOCHSTRASSER, K. :

Nachweis von Komplexen zwischen Antitrypsin (AT)
und Proteasen bei Erkrankungen im HNO-Bereich.

Arch.klin.exp.Ohr-,Nas.-u.Kehlk.-Heilk.

205 (1973), S. 355

14) HOCHGESAND, K., KASTENBAUER, E.R., HOCHSTRASSER, K. :

Die proteolytische Aktivität entzündlicher Ohrsekrete.

Arch.klin.exp.Ohr-,Nas.-u.Kehlk.-Heilk.,

Kongreßbericht 1974 / II.Teil, 207 (1974), S. 466

15) HOCHSTRASSER, K. :

Bronchitis : Neues Therapieprinzip.

Ärztl. Praxis 36 (1973), S. 1749

16) HOCHSTRASSER, K., BRETZEL, G., FEUTH, H., HILLA, W.,
LEMPART, K. :

The Inter-alpha-Trypsin Inhibitor as Precursor
of the Acid-Stable Proteinase Inhibitors in Human
Serum and Urine.

Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 357 (1976), S. 153

17) HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., FALL, J., KEMKES, B. :

Säurestabile Proteaseninhibitoren im Blutplasma bei
verschiedenen Nephropathien.

Klin.Wschr. 52 (1974), S. 1015

- 18) HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., HOCHGESAND, K. :
Proteinase Inhibitors of the Respiratory Tract :
Studies on the Structural Relationship between
Acid-Stable Inhibitors Present in the Respiratory
Tract, Plasma and Urine.
In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd
International Research Conference (Bayer-Symposium V).
Ed. : H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and
E. TRUSCHEIT
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 111
- 19) HOCHSTRASSER, K., FEUTH, H., STEINER, O. :
Zur Charakterisierung der säurestabilen Proteasen-
inhibitoren aus Humanplasma.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 354 (1973), S. 927
- 20) HOCHSTRASSER, K., HAENDLE, H., REICHERT, R., WERLE, E. :
Über Vorkommen und Eigenschaften eines Proteasenin-
hibitors im menschlichen Nasensekret.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 352 (1971), S. 954
- 21) HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., HEIMBURGER, N. :
Antigenic Relationship between the Human Bronchial
Mucus Inhibitor and Plasma Interalpha-Trypsin.
Inhibitor
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 354 (1973), S. 587
- 22) HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S.,
WERLE, E. :
Detection and Isolation of a Second Acid Stable
Proteinase Inhibitor from Human Bronchial Mucus.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 354 (1973), S. 923

- 23) HOCHSTRASSER, K., REICHERT, R., SCHWARZ, S., WERLE, E.:
Isolierung und Charakterisierung eines Proteasen-
inhibitors aus menschlichem Bronchialsekret.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 353 (1972), S. 221
- 24) HOCHSTRASSER, K., THEOPOLD, H.M., BRANDL, O. :
Zur Hemmbarkeit der Proteasen aus *Pseudomonas*
aeruginosa durch α_2 -Makroglobulin.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 354 (1974), S. 1013
- 25) HOCHSTRASSER, K., WERLE, E. :
Reindarstellung der Trypsininhibitoren aus Keimen
von Weizen- und Roggensamen, Lokalisierung der
aktiven Zentren.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol.Chem. 350 (1969), S. 249
- 26) JANOFF, A. :
Neutrophil Proteases in Inflammation.
Annual Review of Medicine 23 (1972), S. 177
- 27) JANOFF, A., SCHERER, T. :
Mediators of Inflammation in Leukocyte Lysosomes,
Teil IX : Elastinolytic Activity in Granules of
Human Polymorphonuclear Leukocytes.
J.exp.Med. 128 (1968), S. 1137
- 28) JONES, J.M., CREETH, J.M., KEKWICK, R.A. :
Thiol Reduction of Human α_2 -Macroglobulin.
Biochem.J. 127 (1972), S. 187
- 29) KASTENBAUER, E.R. :
Enzymatische und immunologische Entzündungsreak-
tionen im Mittelohr.
Z. Laryng.Rhinol. 54 (1975), S. 177

- 30) KASTENBAUER, E.R., HOCHGESAND, K., HOCHSTRASSER, K.,
TAPPERMANN, G. :

Der Nachweis von Spaltprodukten der Immunglobuline
bei chronischen Ohreiterungen.

Z. Laryng.Rhinol. 54 (1975), S. 604

- 31) KAWABATA, J., ISHII, H. :

Scanning electron microscopic investigations of
the human ear ossicles; surface observation of normal
and pathologic ear ossicles.

J. otolaryng.Jap. 74 (1971), 2, 16

- 32) KIMBEL, P., MASS, B., IKEDA, T., WEINBAUM, G. :

Emphysema in Dogs Induced by Leukocyte Contents.

In : Pulmonary Emphysema and Proteolysis.

Ed.: C. MITTMANN

Academic Press New York - London, 1972, S. 411

- 33) KRESS, L.F., LASKOWSKI, M. :

Purification, Properties and Composition of α_1 -
Trypsin Inhibitor from Human Plasma.

In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd
International Research Conference (Bayer-Symposium V).

Ed.: H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and

E. TRUSCHEIT

Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 23

- 34) KÜPPERS, F. :

Human α_1 -Antitrypsin Phenotypes.

In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd
International Research Conference (Bayer-Symposium V).

Ed. : H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and

E. TRUSCHEIT

Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 40

- 35) LASKOWSKI, M., WU, F.C. :
Temporary Inhibition of Trypsin.
J.Biol.Chem. 204 (1953), S. 797
- 36) LAURELL, C.B., ERIKSSON, S. :
Elektrophoretic α_1 -Pattern of Serum α_1 -
Antitrypsin Deficiency.
Scand.Lab.Invest. 15 (1963), S. 132
- 37) MEINKE, G., BERK, R.S. :
In vivo Studies with a Toxic Fraction of
Pseudomonas aeruginosa.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 135 (1970), S. 360
- 38) MOSKOWITZ, W., HEINRICH, G. :
Bacterial Inactivation of Human Serum α_1 -
Antitrypsin : A Possible Factor in the Pathogenesis
of Pulmonary Disease Related to Antitrypsin Deficiency
States.
In : Pulmonary Emphysema and Proteolysis.
Ed.: C. MITTMANN
Academic Press New York - London 1972, S. 261
- 39) MOVIHARA, K. :
Production of Elastase and Proteinase by
Pseudomonas aeruginosa.
J. Bacteriol. 88 (1964), S. 745
- 40) PEANASKY, R.J., LASKOWSKI, M. :
Partial Purification of the Trypsin Inhibitor
from Blood Plasma.
J. Biol.Chem. 204 (1953), S. 153

- 41) REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K. :
Veränderungen des Proteaseninhibitorspiegels im
menschlichen Nasensekret im Verlauf verschiedener
Rhinopathien.
Z. Laryng.Rhinol. 51 (1972), S. 73
- 42) REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K. :
Zur Biochemie und Physiologie von Proteaseninhibi-
toren im Bereich des Respirationstrakts.
Arch.klin.exp.Ohr-,Nas.-u.Kehlk.Heilk.,
Kongreßbericht 1972/II. Teil, 202 (1972), S. 377
- 43) REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., CONRAD, G. :
Untersuchungen zur Proteasenhemmkapazität des mensch-
lichen Bronchialsekrets.
Pneumologie 147 (1972), S. 13
- 44) REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., ELGAS, W. :
Der Nachweis eines niedermolekularen Proteasenin-
hibitors in Schleimhäuten der Atemwege.
Mschr.Ohr.hk.,Wien 107 7 (1973), S. 331
- 45) REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., WERLE, E. :
Der Proteaseninhibitorspiegel im menschlichen Nasen-
sekret unter physiologischen und pathophysiologi-
schen Bedingungen.
Klin.Wschr.49 (1971), S. 1234
- 46) REICHERT, R., HOCHSTRASSER, K., WERLE, E. :
Nachweis eines niedermolekularen Proteaseninhibitors
in menschlichem Bronchialsekret.
Z. Laryng.Rhinol. 51 (1972), S. 190

- 47) RINDERKNECHT, H., GOOKAS, M.C. :
On the Physiological Role of α_2 -Macroglobulin.
Biochem.biophys.Acta 295 (1973), S. 233
- 48) RINDERKNECHT, H. GOOKAS, M.C. :
Role for α_2 -Macroglobulin in Haemostatic Balance.
Nature (London) New Biol. 239 (1972), S. 116
- 49) ROBERTS, R.C., RIESEN, W.A., HALL, P.K. :
Studies on the Quaternary Structure of Human Serum
 α_2 -Macroglobulin.
In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd
International Research Conference (Bayer-Symposium V).
Ed.: H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and
E. TRUSCHEIT
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 63
- 50) SAUNDERS, R., DYCE, B.J., VANNIER, W.E., HAVERBACK, B.J. :
The Separation of α_2 -Macroglobulin into Five
Components with Differing Electrophoretic and Enzyme-
Binding Properties .
J.clin.Invest. 50 (1971), S. 2376
- 51) SCHÖNDORF, J., MÄUSLE, E. :
Epithelveränderungen an der chronisch entzündeten
Paukenschleimhaut .
Arch.klin.exp.Ohr-,Nas.-u.Kehlk.-Heilk.,
Kongreßbericht 1973/II.Teil, 205 (1973), S. 175
- 52) SCHÖNENBERGER, M., SCHMIDTBERGER, R., SCHULTZE, H.E. :
Über das α_2 -Makroglobulin.
Z.Naturforschg 13 b (1958), S. 761

- 53) SCHULTZE, H.E., HEIDE, K., HAUPT, H. :
Alpha₁-Antitrypsin aus Humanserum.
Klin.Wschr. 40 (1962), S. 427
- 54) SCHWICK, H.G., HEIMBURGER, N. :
Biochemie der Fibrinolyse.
In : Therapeutische und experimentelle Fibrinolyse.
Hrsgb. : V. HIEMEYER
Schattauer-Verlag Stuttgart-New York 1969, S. 9
- 55) SCHWICK, H.G., HEIMBURGER, N., HAUPT, H. :
Antiproteinasen des Humanserums.
Z.ges.inn.Med. 21 (1966), S. 193
- 56) SHARP, H.L., FREIER, E.F. :
Familial Cirrhosis.
In : Pulmonary Emphysema and Proteolysis.
Ed.: C. MITTMANN
Academic Press New York - London 1972, S. 101
- 57) SHULMAN, N.R. :
A Proteolytic Inhibitor with Anticoagulant
Activity Separated from Human Urine and Plasma.
J. Biol.Chem. 213 (1955), S. 655
- 58) Steinbuch, M.M., AUDRAN, R. :
Biology and Pathology of Plasma Inhibitors.
In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd
International Research Conference (Bayer-Symposium V).
Ed. : H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and
E. TRUSCHEIT
Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 78

- 59) TAPPERMANN, G. :

Nachweis von Spaltprodukten der Immunglobuline bei
chronischen Eiterungen im menschlichen Mittelohr.

Inauguraldissertation München 1976, S. 46

- 60) TRAVIS, J., JOHNSON, D., PANNELL, R. :

Properties of Human α_1 -Antitrypsin.

In : Proteinase Inhibitors, Proceedings of the 2nd
International Research Conference (Bayer-Symposium V).

Ed.: H. FRITZ, H. TSCHESCHE, L.J. GREENE and

E. TRUSCHEIT

Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 1974, S. 31

- 61) VOGEL, R., TRAUTSCHOLD, J., WERLE, E. :

Natürliche Proteinase-Inhibitoren.

Thieme-Verlag Stuttgart 1966, S. 40

- 62) WERB, Z., BURLEIGH, P.M., BARRETT, A.J., STARKEY, P.M. :

The Interaction of α_2 -Macroglobulin with
Proteinases.

Biochem.J. 139 (1974), S. 359

H. LEBENSLAUF

Am 1. August 1945 wurde ich als zweites Kind der Augenärzte Dr. med. Adolf Brohr und Dr. med. Magdalena Brohr, geb. Schepss, in Gerolzhofen/Ufr. geboren.

Im Jahre 1948 übersiedelten wir nach Burghausen an der Salzach; dort besuchte ich von 1951 bis 1955 die Volksschule und von 1955 bis 1964 das humanistische Gymnasium, an dem ich im Juli 1964 die Reifeprüfung ablegte.

Von Oktober 1964 bis März 1966 leistete ich den 18-monatigen Pflichtwehrdienst bei der Bundeswehr ab.

Im Sommer 1966 begann ich das Studium der Rechtswissenschaft an der Universität München, das ich mit dem 1. juristischen Staatsexamen im Herbst 1970 abschloß. Während der anschließenden Referendarzeit nahm ich mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern und nach entsprechender Zulassung im Sommersemester 1972 das Studium der Zahnmedizin an der Universität München auf. Die naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung bestand ich im April 1973.

Im März 1974 absolvierte ich das 2. juristische Staatsexamen.

Der zahnärztlichen Vorprüfung unterzog ich mich im Oktober 1974.

Die zahnärztliche Prüfung bestand ich am 13. Juli 1977.

